

KEHITYSASTEEN JA SÄILÖNTÄAINEEN VAIKUTUS VALKOLUPIINI-
VEHNÄSÄILÖREHUN KÄYMISLAATUUN JA AEROBISEEN
STABIILISUUTEEN

Marjukka Lamminen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kotieläinten ravitsemustiede
Maaliskuu 2014

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Marjukka Lamminen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Kehitysasteen ja säilöntäaineen vaikutus valkolupiini-vehnäsäilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma	Aika — Datum — Month and year Maaliskuu 2014	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 103 s.	
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Tämän maisterintutkielman tavoitteena oli tutkia valkolupiinin (<i>Lupinus albus</i>) ja kevätevehnän (<i>Triticum aestivum</i>) seoskasvuston soveltuvuutta kokoviljasäilörehun raaka-aineeksi. Tutkimuksessa oli mukana kaksi seossuhdetta ja kaksi kehitysastetta. Erilaisilla säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen laatua verrattiin kontrollina ilman säilöntäainetta tehtyyn painorehuun.</p> <p>Koerehut tehtiin Helsingin yliopiston Maataloustieteiden laitoksella 13. ja 27.8.2012. Ensimmäisessä kasvuasteessa (K1) vehnä oli taikinatuleentumisen alussa ja valkolupiinin palot olivat vihreitä ja täyttivät 50 % palkojen väliseinien välisestä tilasta. Toisessa kasvuasteessa (K2) vehnä oli taikinatuleentumisen lopussa ja lupiinin siemenet täyttivät 75 % palkojen väliseinien välisestä tilasta. Niiton jälkeen kasvustoista erotettiin eri kasvilajit, joista muodostettiin kaksi seosta. Ensimmäisessä (S1) oli tuorepainosta 1/3 valkolupiinia ja 2/3 vehnää, toisessa (S2) oli 2/3 valkolupiinia ja 1/3 vehnää. Säilöntäainekäsittelyt olivat: 1) ei säilöntäainetta (painorehu), 2) muurahaishappo (100 %:na 4 l/t), 3) natriumnitriitin (0,75 kg/t) ja heksamiinin (0,5 kg/t) seos ja 4) <i>Lactobacillus plantarum</i> 1x10⁵ pmy/g. Rehut säilöttiin laboratoriosiiloissa kolmena rinnakkaisena. Siilot avattiin 100 vrk säilönnän jälkeen. Kokeessa määritettiin raaka-aineen koostumus, rehujen säilönnällinen laatu ja aerobinen stabiilisuus.</p> <p>Raaka-aineesta muodostettujen seosten kuiva-ainepitoisuus oli lupiinivaltaisissa seoksissa noin 220 g/kg ja vehnävaltaisissa seoksissa noin 300 g/kg. Valkolupiinin märkyys ja korkea puskurikapasiteetti, seoksen alhainen sokeripitoisuus ja klostridikontaminaatio vaikeuttivat säilöntää. Lupiinin osuuden noustessa seoksen raakavalkuais- ja sokeripitoisuus lisääntyi, mutta säilöttävyys heikkeni.</p> <p>Säilöntä ilman säilöntäainetta tuotti huonolaatuista rehua kaikissa rehuerissä. Painorehuissa esiintyi runsaasti voi-happoa ja muita virhe-ikäymiselle tyypillisiä käymishappoja ja valkuaisen hajoavuus oli suurta. Biologisella säilöntäaineella säilöttyjen rehujen laatu oli hyvä ensimmäisessä kasvuasteessa, kun raaka-aine oli kuivempaa ja seosten sokeripitoisuus oli suurempi. Toisessa kasvuasteessa biologinen säilöntäaine ei kuitenkaan toiminut yhtä hyvin ja rehujen laatu oli voi-happo- ja ammoniakkipitoisuuden perusteella huono. Todennäköisesti muurahaishapon annostus ei ollut tässä kokeessa riittävä raaka-aineen vaikeaan säilöttävyyteen ja klostridimäärään nähden. Muurahaishapporehuissa esiintyi kaikissa rehuerissä paljon voi-happoa. Toisessa kehitysasteessa myös valkuaisen hajoavuus oli suurta. Natriumnitriitin ja heksamiinin seoksen toimintavarmuus oli tässä kokeessa tutkituista säilöntäaineista paras. Natriumnitriitin ja heksamiinin seos tuotti hyvälaatuista säilörehua kaikissa rehuerissä. Vehnävaltaisissa seoksissa ei esiintynyt voi-happoa lainkaan ja lupiinivaltaisissa seoksissakin pitoisuudet olivat erittäin pieniä. Suurin osa rehuista oli 13 päivän mittausjakson aikana aerobisesti stabiileja. Vain muutamat siilot lämpenivät (5/48 kpl) ja ne olivat aerobisesti varsin epästabiileja, sillä lämpeneminen tapahtui noin kahdessa vuorokaudessa ilmalle altistumisesta. Lämmenteistä siiloista valtaosa (4 kpl) oli biologisella säilöntäaineella säilöttyjä rehuja.</p> <p>Tämän tutkimuksen perusteella valkolupiini-vehnäkokoviljasäilörehun säilöntä on haastavaa. Raaka-aineen koostumuksen perusteella rehu kannattaa tehdä lupiinivaltaisemmasta seoksesta ja korjata aikaisemmassa vaiheessa, jos halutaan maksimoida rehun valkuais- ja sokeripitoisuus. Säilöntä on tällöin kuitenkin kuiva-ainepitoisuuden ja puskurikapasiteetin perusteella vaikeampaa ja sato jää pienemmäksi kuin myöhemmässä korjuussa. Säilönnässä tulee aina käyttää säilöntäainetta. Säilöntäaineista parhaiten toimi natriumnitriitin ja heksamiinin seos.</p>			
<p>Avainsanat — Nyckelord — Keywords</p> <p>valkolupiini, säilörehu, säilöntäaine, käymislaatu, muurahaishappo, maitohappobakteeri, natriumnitriitti, heksamiini</p>			
<p>Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited</p> <p>Viikin kampuskirjasto ja Maataloustieteiden laitos, kotieläinten ravitsemustieteen kirjasto</p>			
<p>Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information</p> <p>Työn ohjaaja: Seija Jaakkola</p>			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Marjukka Lamminen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title The effect of growth stage and silage additive on the fermentation characteristics and aerobic stability of white lupin-wheat silage			
Oppiaine — Läroämne — Subject Animal nutrition			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year March 2014	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 103 p.
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>The aim of this study was to investigate the ensilability of white lupin (<i>Lupinus albus</i>) and spring wheat (<i>Triticum aestivum</i>) bi-crop when ensiled as a whole-crop. There were two plant mixture ratios and two growth stages in the study. Silages made with different additives were compared with untreated silages, which were as a control.</p> <p>The experimental silages were made at the research farm of the University of Helsinki in Viikki on August 13th and 27th, 2012. At the first growth stage (K1) wheat was at the beginning of dough stage and the pods of white lupin were green and the seeds filled 50 % of space between septa. At the second growth stage (K2) wheat was at the end of dough stage and the seeds filled 75 % of space between septa. After mowing plant species were separated and two ratios were formed. The first ratio comprised 1/3 white lupin and 2/3 wheat and the second 2/3 white lupin and 1/3 wheat of fresh weight. The additive treatments were: 1) without additive (untreated), 2) formic acid (4 l/t as a 100% acid), 3) the mixture of sodium nitrite (0,75 kg/t) and hexamine (0,5 kg/t) and 4) <i>Lactobacillus plantarum</i> 1x10⁶ cfu/g. Silages were ensiled in the laboratory scale silos in triplicate. Silos were opened after 100 days of ensiling. The chemical composition of raw material at harvest and the fermentation characteristics and aerobic stability of silages were determined in the experiment.</p> <p>The dry matter content of plant mixtures was about 220 g/kg in the mixtures with higher proportions of lupin and about 300 g/kg in the mixtures with higher proportions of wheat. The preservation of silages were impeded by the low dry matter content and high buffering capacity of white lupin, the low sugar content of the mixtures and clostridial contamination. As the proportion of lupin increased the crude protein and sugar content of the mixture increased but the ensilability of the mixture declined.</p> <p>Preservation without additive produced low quality silages in all silage batches. High amounts of ammonia, butyric acid and other fermentation acids typical of bad silage fermentation were detected in the untreated silages. The fermentation quality was good in silages made with <i>Lactobacillus plantarum</i> at the first growth stage when the raw material was dryer and the sugar content of mixtures were higher. Based on the butyric acid and ammonia concentrations the use of <i>Lactobacillus plantarum</i> resulted in poor quality silages at the second growth stage. The dose of formic acid in this experiment wasn't probably high enough in regard to the poor ensiling properties of raw material and clostridial contamination. High amounts of butyric acid were detected in all silages treated with formic acid. At the second growth stage the ammonia concentrations were also high. The most effective additive in the experiment was the mixture of sodium nitrite and hexamine resulting in good fermentation quality in all silage batches. No butyric acid was detected from the mixtures with higher proportions of wheat and amounts were extremely low also in the mixtures with higher proportions of lupin. Most of the silages were aerobically stable during 13 days of the period of measurement. Only a few silos (5 out of 48) were aerobically deteriorated and those silos were very unstable as the warming was noticed within 2 days. Most of the deteriorated silos (4) were treated with biological additive.</p> <p>Based on the present results the ensiling of white lupin-wheat whole-crop silage is difficult. The composition of raw material suggests that silage should be made from the mixture where the proportion of lupin is higher and cut at the earlier growth stage if the maximization of crude protein and sugar content is wanted. However, the ensilability of raw material is more difficult on the basis of dry matter content and buffering capacity. The yield is also lower than later in the growth stage. Silage additive should always be used when ensiling white lupin. The mixture of sodium nitrite and hexamine was the most effective additive in the study.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords white lupin, silage, silage additive, fermentation quality, formic acid, lactic acid bacteria, sodium nitrite, hexamine			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikki Campus Library and Department of Agricultural Sciences, Animal science library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisor: Seija Jaakkola			

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET JA KÄSITTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 VALKOLUPIINI KOKOVILJASÄILÖREHUN RAAKA-AINEENA	9
2.1 Valkolupiinin viljely	9
2.2 Rehun säilöntä ja säilöntälaatuun vaikuttavat tekijät	9
2.3 Lupiinit kokoviljasäilörehun raaka-aineena.....	13
2.4 Valkolupiinin haitta-aineet	15
2.5 Lupiinisäilörehu nautojen ruokinnassa	16
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	18
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	19
4.1 Koerehujen valmistus	19
4.2 Aerobinen stabiilisuus	22
4.3 Näytteiden otto ja analysointi	23
4.3.1 Raaka-aine- ja kehitysastenäytteet.....	23
4.3.2 Fraktiointi	23
4.3.3 Analyysit	23
4.4 Tulosten laskenta ja tilastolliset analyysit	25
5 TULOKSET	28
5.1 Satotiedot	28
5.2 Fraktioinnit.....	29
5.3 Säilörehun raaka-aineen koostumus	29
5.4 Säilörehun koostumus ja säilönnällinen laatu.....	33
5.4.1 Kuiva-aine ja tuhka	33
5.4.2 pH	33
5.4.3 Sokeri	34
5.4.4 Valkuaisen hajoaminen säilönnän aikana	39
5.4.5 VFA ja alkoholit.....	40
5.5 Tuorepaino- ja kuiva-ainetappiot	46
5.6 Aerobinen stabiilisuus	48
6 TULOSTEN TARKASTELU	52
6.1 Satotaso ja fraktioinnit	52
6.2 Raaka-aineen koostumus.....	53
6.3 Säilöntälaatu.....	67
6.4 Tuorepaino- ja kuiva-ainetappiot	78
6.5 Aerobinen stabiilisuus	80

7 JOHTOPÄÄTÖKSET	83
LÄHTEET	85
LIITTEET	102
Liite 1: Lupiinin ensisijaiset ja toissijaiset kehitysvaiheet ja niiden kuvaukset.....	102

LYHENTEET JA KÄSITTEET

ADF	Happodetergenttikuitu
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
D-arvo	Rehun, raaka-aineen tai kasvin sulavuus
GE	Bruttoenergia
Inokulantti	Biologinen säilöntäaine
K1	Kasvuaste 1
K2	Kasvuaste 2
ka	Kuiva-aine
LAB	Biologinen säilöntäaine, myös inokulantti
ME	Muuntokelpoinen energia
MH	Muurahaishappo
NaHe	Säilöntäaine, jossa on natriumnitriittiä ja heksamiinia
NE _L	Maidontuotantoon käytettävissä oleva nettoenergia
NDF	Neutraalidetergenttikuitu
pmy	Pesäkkeitä muodostava yksikkö
PR	Painorehu, säilöntä ilman säilöntäainetta
qPCR	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
S1	Seos 1
S2	Seos 2
SEM	Keskiarvon keskivirhe
VFA	Haihtuvat rasvahapot

1 JOHDANTO

Suomessa nurmisäilörehu on perinteinen nautojen perusrehu, jota naudat ovat myös sopeutuneet käyttämään erinomaisesti. Nurmien uudistamisen vuoksi rehuvilja on karjatililla kuitenkin lähes välttämätön viljeltävä. Työnkäytön ja koneistuksen kannalta karjatilalla on usein kuitenkin järkevämpää keskittyä karkearehuntuotantoon ja käyttää urakointia viljan puitiin tai jopa hankkia vilja kokonaan tilan ulkopuolelta. Välttämätön vilja-ala voitaisiin tällöin hyödyntää karkearehuntuotannossa, jos se korjattaisiin kokoviljasäilörehuksi. Kokoviljasäilörehulla on useita etuja tavalliseen nurmisäilörehuun verrattuna. Nurmien viljelyala ja uudistustarve pienenee, lisäksi osa karkearehualasta on käytettävissä nurmien uudistamiseen ja lannan levitykseen. Erityisen tärkeää tämä on kuivalantaa käyttävillä tiloilla, joilla lantaa on lähes mahdoton levittää nurmelle. Kokoviljasäilörehua tehtäessä myös säilörehunkorjuun kaksi työhuippua jakaantuvat kolmeen ja rehuviljan tuotannon sääriski pienenee. (Suokannas ym. 2003).

Kokoviljasäilörehun arvoa märehtijöiden ruokinnassa kuitenkin heikentää sen pieni valkuaispitoisuus ja hyvin sulavaa nurmirehua huonompi sulavuus (MTT 2013). Ruokintatutkimusten perusteella kokoviljasäilörehulla voidaan korvata 40 % nurmirehusta ilman, että lypsylehmien maitotuotos vähenee (Jaakkola ym. 2009). Maitorotuisten sonnien ruokinnassa ohra- tai ohra-ruisvirnakokoviljasäilörehu voi korvata kokonaan sulavuudeltaan keskimääräisen nurmisäilörehun (Huuskonen ja Joki-Tokola 2010). Kokoviljasäilörehun valkuaisarvo paranee, kun rehu tehdään viljan ja palkoviljakasvin seoksesta. Palkokasvisäilörehu on valkuaisrehuja (rypsi, soija) halvempi ja jäljitettävä kotoperäinen valkuaislähde, joka voi parantaa lypsykarjatilojen tuotannon tehokkuutta (Adesogan ym. 2004, Cavallarin ym. 2007). Palkokasvit ovat kuitenkin hankalia säilöttäviä niiden korkean puskurikapasiteetin sekä pienen vesiliukoisten hiilihydraattien ja kuiva-ainepitoisuuden vuoksi (McDonald ym. 1991). Kotimaisissa tutkimuksissa kokoviljasäilörehun kuiva-ainepitoisuus on ollut ilman esikuivausta kohtuullisen suuri (283–441 g/kg, Jaakkola ym. 2009), mikä helpottaa säilöntää kun säilörehu tehdään palkokasvin ja viljan seoskasvustosta.

Viljojen ja palkokasvien seosviljelyllä on todettu olevan useita etuja tuotannon, talouden ja ympäristön kannalta. Seosviljelyn on todettu lisäävän satoja ja vähentävän satovaihtelua, vähentävän rikkakasveja ja kasvitauteja ja tehostavan resurssien ja tuotantopanosten

käyttöä (Hauggaard-Nielsen ym. 2008). Kun viljojen ja palkokasvien seosviljelyllä korvataan viljojen monokulttuureja ja palkokasvien typensidonnasta ansiosta voidaan vähentää typpilannoitusta maatalouden energiankäyttö, kasvihuonekaasupäästöt, otsoninmuodostus, happamoituminen ja ympäristön saastuminen vähenevät. Tämä johtuu pääasiassa siitä, että typpilannoitteiden käyttö ja maanmuokkauksen tarve vähenevät ja viljelykierto monipuolistuu. Monipuolisemman viljelykierron ansiosta rikkakasvit ja kasvitautit puolestaan vähenevät ja kasvinsuojelun tarve pienenee. Viljojen ja palkokasvien seosviljelyssä typen huuhtoutumispotentiaali tosin lisääntyy puhdaskasvustoihin verrattuna, mutta tätä voidaan vähentää hyödyntämällä alus- ja kerääjäkasveja tai syyskylvöisten palkoviljojen aikaisella kylvöllä, jos se on mahdollista. (Nemecek ym. 2008).

2 VALKOLUPIINI KOKOVILJASÄILÖREHUN RAAKA-AINEENA

2.1 Valkolupiinin viljely

Viljeltävät lupiinit (*Lupinus*) ovat hernekasveihin (*Leguminosae*, alaheimo *Fabaceae*) kuuluvia yksivuotisia palkokasveja. Lupiineihin kuuluu useita eri lajeja, joista neljää (*L. albus*, valkolupiini; *L. angustifolius*, sinilupiini; *L. luteus*, keltalupiini ja *L. mutabilis*, tuoksulupiini) viljellään maailmanlaajuisesti ihmisten ja eläinten ravinnoksi sekä viherlannoituskasvina (Huyghe 1997). Kaikki nämä lupiinilajit voidaan korjata joko säilörehuksi tai puida palkoviljoina. Maailmalla lupiinin siemenet tavallisesti puidaan ja eläinten ruokinnassa ne hyödynnetään valkuaisrehuna. Suomessa sinilupiinin aikaiset lajikkeet soveltuvat palkoviljantuotantoon Vaasan korkeudelle asti. Valkolupiini ei ehdi tuleentua Suomen olosuhteissa ja se soveltuukin maassamme paremmin biomassan ja kokoviljasäilörehun tuotantoon. Aiemmissa Suomessa tehdyissä tutkimuksissa on todettu valkolupiinilajikkeiden Energy ja Ludic sopivuus kokoviljasäilörehuseoksiin. (Stoddard ym. 2012).

Valkolupiinin kasvu-aika on pitkä sini- ja keltalupiineihin verrattuna. Iso-Britanniassa valkolupiinin Dieta-lajike tarvitsee keskimäärin 165 päivää kehittyäkseen tuleentumisvaiheeseen. Sinilupiinilajike Sonet puolestaan tarvitsee tähän vain 135 päivää ja keltalupiinilajike Wodjil 145 päivää. (Landrock-White 2004). Kanadassa valkolupiinilajikkeet Ultra ja Primorski tarvitsevat 98–137 päivää tuleentumiseen sääoloista riippuen (Faluyi ym. 1997). Viikissä tehdyissä sinilupiinin siemensatokokeissa Sonet-, Haags Blaue- ja Boruta-lajikkeiden kasvuajat olivat 946, 930–982 ja 1040–1107 °C tehoisaa lämpösummaa (Lizarazo ym. 2010, Stoddard ym. 2012) tai noin 100 päivää (Stoddard 2012). Aikaisin härkäpapulajike Kontu puolestaan tarvitsi tuleentuakseen 990–1055 °C tehoisaa lämpösummaa. (Lizarazo ym. 2010, Stoddard ym. 2012). Helsingissä keskimääräinen kasvukauden aikainen tehoisa lämpösummakertymä on vuosina 1981–2010 ollut 1453 °C ja Jyväskylässä 1191 °C (Ilmatieteen laitos 2013).

2.2 Rehun säilöntä ja säilöntälaatuun vaikuttavat tekijät

Säilörehun laatu riippuu monista tekijöistä, mutta tärkeimpiä niistä ovat rehun kuiva-ainepitoisuus ja helposti fermentoituvien substraattien määrä sekä säilöntäprosessin että rehun syöntilaadun kannalta tarkasteltuna. Märkien palkokasvirehujen säilöntää rajoittavat usein vesiliukoisten hiilihydraattien puute, korkea puskurikapasiteetti ja klostridien suuri

määrä. Säilöntälaadultaan huonon, märän palkokasvisäilörehun syönti ja hyväksikäyttö on usein huono. (Jaurena ja Pichard 2001).

Rehun säilönnän tavoitteena on ylläpitää rehun laatu koko säilönnän ajan mahdollisimman vähin kuiva-aine- ja energiatappioin. Tässä onnistumisen edellytyksenä on, että kasvin soluhengitystä, proteolyyttistä aktiivisuutta, klostridiaktiivisuutta ja aerobisten mikrobien kasvua rajoitetaan. Jotta tämä onnistuisi, on erittäin tärkeää, että säilönnän yhteydessä saavutetaan nopeasti anaerobiset olosuhteet ja ne myös pysyvät yllä koko säilönnän ajan. (Muck 1988). Säilönnän toinen päätavoite on rajoittaa haitallisten mikro-organismien, kuten klostridien ja enterobakteerien, kasvua (McDonald ym. 1991). Maitohappokäymisen tuottama maitohappo lisää rehun vetyionipitoisuutta, mikä ehkäisee klostridien kasvua. Lisäksi myös ei-dissosioituneet hapot itsessään estävät haittamikrobien kasvua. (McDonald ja Whittenbury 1973). Sama vaikutus voidaan saada myös säilöntähappoja käyttämällä. Rehun säilöntäaineet voidaan jakaa maitohappobakteerien kasvua stimuloiviin ja mikrobien kasvua osittain tai kokonaan estäviin aineisiin (McDonald ym. 1991). Biologiset säilöntäaineet, eli yleensä maitohappobakteerit (inokulantit) ja entsyymit kuuluvat ensimmäiseen ryhmään ja erilaiset hapot ja muut kemikaalit, kuten natriumnitriitti (NaNO_2) ja heksametyleenitetra-amiini (heksamiini, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$), jälkimmäiseen.

Maitohappokäymisen aikaansaama pH:n lasku edellyttää anaerobisia olosuhteita, riittävästi substraattia maitohappobakteereille ja tarpeeksi suuren määrän maitohappobakteereja. Maitohappokäymiseen tarvittavan substraatin määrä riippuu rehukasvista ja korjuuolosuhteista, sillä rehun puskurikapasiteetin ja kosteuspitoisuuden noustessa substraattia tarvitaan enemmän. Maitohappobakteereja tarvitaan keskimäärin 10^8 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä (pmy) /g rehua, jotta pH:n laskua voi tapahtua. Koska tämä pitoisuus on paljon suurempi kuin inokulanteissa, inokulanttien tärkein ominaisuus on nopea lisääntyminen rehumassassa. Myös inokulantteja käytettäessä substraatin riittävä määrä ja sen populaation suhde rehun luonnolliseen bakteeripopulaatioon verrattuna on tärkeää. (Muck 1988).

Muurahaishapon (CH_2O_2) säilöntävaikutus perustuu nopeaan pH:n laskuun heti annostelun jälkeen, ja sitä seuraavaan kasvinesteiden vapautumiseen rehumassasta sekä lisäksi hapon suoraan antimikrobiologiseen vaikutukseen (Winters ym. 1987). Heksamiinin ja natriumnitriitin säilöntävaikutus perustuu haittamikrobien kasvun suoraan ehkäisyyn.

Natriumnitriitti toimii säilönnän alkuvaiheessa (Weissbach ym. 1989) ja se vaikuttaa rehussa samoin kuin rehuraaka-aineesta peräisin oleva nitraatti. Nitraatti (NO_3) hajoaa nitriitiksi (NO_2), joka hajoaa erittäin myrkylliseksi typpioksidiksi (NO) ja dityppioksidiksi (N_2O) (Lättemäe 1997). Nitriitti ja typpioksidi rajoittavat valikoivasti klostridien ja enterobakteerien kasvua (Hellberg 1967, Spoelstra 1983), mutta eivät maitohappobakteerien (Hellberg 1967). Natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella säilötyn rehun pH:n lasku perustuukin luontaisten maitohappobakteerien tuottamaan maitohappoon, nämä säilöntäaineet eivät itsessään luo rehuun happamia olosuhteita.

Natriumnitriitin tuottama typpioksidi katoaa lopulta säilörehusta haihtumalla ilmaan ja reagoimalla säilörehun komponenttien kanssa. Nitraatin ja nitriitin hajoamisen tärkein lopputuote on ammoniakki (NH_3). Säilörehussa, jonka pH on korkea, kaikki typpioksidi on yleensä hävinnyt muutaman viikon kuluttua säilönnän alusta (Spoelstra 1985). Knický ja Lingvall (2001) havaitsivat natriumnitriitillä säilötyn rehun nitraatti- ja nitriittipitoisuuden alentuneen jo 14 päivän kuluttua säilönnän alusta. Tämän vuoksi kaikki nitraattia tai nitriittiä sisältävät säilöntäaineet toimivat tehokkaasti vain rajoitetun ajan (Lättemäe 1997).

Heksamiini puolestaan toimii säilönnän jälkivaiheissa ja se vaatii toimiakseen happamat olosuhteet (Weissbach ym. 1989). Neutraalissa vesiliuoksessa heksamiini on stabiili (Blažević ym. 1979). Säilörehun pH:n laskiessa heksamiini hydrolysoituu hitaasti muodostaen formaldehydiä ja ammoniakkia (Weissbach ym. 1989). Formaldehydi tuhoaa myös haittamikrobien itiöitä (Setlow 2006). Formaldehydin muodostumisesta huolimatta formaldehydijäämät valmiissa säilörehussa ovat olleet pieniä, eikä heksamiinin käyttö ole vaikuttanut maidon formaldehydipitoisuuteen (Weissbach ym. 1989).

Säilöntäaineiden käytön lisäksi haittamikrobien kasvua voidaan ehkäistä esikuivaamalla rehua. Rehun liukoiset aineet tiivistyvät ja rehun vesiaktiivisuus (a_w) vähenee, kun rehu esikuivataan korkeaan kuiva-ainepitoisuuteen (Greenhill 1964, ref. Pahlow ym. 2003). Pieni vesiaktiivisuus ehkäisee mikro-organismien kasvua. Klostridit ovat herkempiä rehun pienelle vesiaktiivisuudelle kuin maitohappobakteerit (McDonald ym. 1991). Tämän vuoksi esikuivaus ehkäisee säilörehun voi happokäymistä (Wieringa 1985, ref. Pahlow ym. 2003). Jos rehu kuivataan yli 550 g/kg kuiva-ainepitoisuuteen, säilörehun käymisellä on vain vähän vaikutusta rehun laatuun. Sen sijaan tätä märemmissä rehuissa pH:n nopea lasku on välttämätöntä. (Muck 1988).

Klostridien kasvu säilörehussa on epätoivottua, koska ne tuottavat voi happoa ja hajottavat aminohappoja erilaisiksi tuotteiksi. Klostridien toiminnan seurauksena rehun pH nousee, mikä mahdollistaa muiden haittamikrobien kasvun. Tämän sekundäärisen käymisen seurauksena säilörehun laatu on huono ja rehun syönti vähenee. (McDonald ym. 1991). Säilörehun klostridi-itiömäärä on tärkein maidon klostridi-itiömäärään vaikuttava tekijä. Maidon ei toivota sisältävän klostridi-itiöitä, sillä ne pilaavat maidosta valmistetun juuston rakenteen ja aiheuttavat makuvirheitä. (Vissers ym. 2006). Tämän vuoksi säilörehun syöttöä tulisi rajoittaa rehun voi happopitoisuuden lisääntyessä (taulukko 1). Rehun pieni kuiva-aine- ja sokeripitoisuus sekä korkea puskurikapasiteetti suosivat klostridien aiheuttamaa voi happokäymistä. Tämän vuoksi valkuaispitoiset säilörehut, esimerkiksi palkokasvi- ja palkokasvinurmisäilörehut, ovat erityisen alttiita sakkarylyttisten ja/tai proteolyttisten klostridien aiheuttamalle voi happokäymiselle. (Auerbach ym. 2012).

Taulukko 1. Voi happopitoisten säilörehujen syöntirajoitukset eri eläinryhmille (Richardt 2012).

Voi happo, g/kg ka	Syöntirajoitus
< 0,3	Harmiton
0,4 – 1,0	Ei ummessa oleville lehmille, eikä ensikoille < 5 kg ka/eläin/päivä useamman kerran poikineille Harmiton nuorille eläimille
1,0 – 3,5	Ei ummessa oleville lehmille, eikä ensikoille < 2,5 kg ka/eläin/päivä kaikille muille eläinryhmille
> 3,5	Syöntikelvoton

Voi happokäymisen lisäksi haittamikrobit voivat aikaansaada myös toisen säilörehun laatua pilaavan prosessin, jälkilämpenemisen. Aerobisella stabiilisuudella tarkoitetaan aikaa, joka kuluu ennen kuin ilman vaikutuksen alaisuudessa olevan säilörehun lämpötila nousee 2 °C ympäristön lämpötilaan verrattuna (Moran ym. 1996). Säilörehun lämpötilan nousu johtuu siitä, että ei-toivottujen mikrobien, kuten laktaattia kuluttavien hiivojen ja bakteerien (esim. etikkahappoa tuottavat bakteerit), ja myöhemmin myös homeiden, määrä lisääntyy. Nämä käyttävät ravinnokseen helposti fermentoituvia hiilihydraatteja ja fermentaatiohappoja ja tuottavat hiilidioksidia ja lämpöä. Säilörehun lämpenemiselle altistavia tekijöitä ovat suuri helposti fermentoituvien hiilihydraattien pitoisuus, rehun suuri patogeenien määrä (maakontaminaatio, vanha kasvimateriaali), siilon huono tiivistäminen ja hidas peittäminen. (Richardt 2012). Helposti säilöttävät rehut, kuten maissisäilörehu, kokoviljasäilörehu ja

melko kuivat nurmi- ja palkokasvisäilörehut, eivät ole alttiita ei-toivottujen bakteerien kasvulle anaerobisten olosuhteiden aikana. Sen sijaan hapelle altistuttuaan ne voivat lämmetä herkästi. Säilöntälaadultaan huonojen rehujen sisältämä voihapo ja etikkahappo ehkäisevät sienien kasvua, kun taas maitohapolla ei tällaisia ominaisuuksia ole. (Auerbach ym. 2012). Tämän vuoksi voi happokäymistä ja jälkilämpenemistä esiintyy harvoin yhtä aikaa samassa rehussa.

2.3 Lupiinit kokoviljasäilörehun raaka-aineena

Lupiinin ja viljojen seoskasvustojen on todettu olevan puhdaskasvustoja satoisampia kokoviljasäilörehuksi korjattuna. Erityisesti valkolupiini-ruisvehnäkasvuston on havaittu olevan satoisuudessa ylivertainen muihin lupiini-viljaseoskasvustoihin ja puhdaskasvustoihin verrattuna. (Azo ym. 2006, 2012). Lupiinien lisääminen viljakasvustojen joukkoon myös kohotti kasvuston raakavalkuaispitoisuutta seoksen vilja- ja lupiinilajista riippumatta (Azo ym. 2006). Valkolupiinin siementen raakavalkuaispitoisuuden on raportoitu olevan suuri (322 g/kg ka) (Erba ym. 2005). Sen sijaan koko kasvuston raakavalkuaispitoisuus jää tyypillisesti tätä pienemmäksi ja sen on raportoitu olevan 128–239 g/kg ka (Jones ym. 1999, Bruno-Soares ja Vaz 2000, Deaville ja Givens 2002, Bruno-Soares ym. 2005a, Fraser ym. 2005, Borreani ym. 2009, Peiretti ym. 2010, Azo ym. 2012). Valkolupiini-vehnäseoskasvuston raakavalkuaispitoisuuden on raportoitu olevan 76–190 g/kg ka kasvuvaiheesta ja lupiinin ja vehnän kylvötiheydestä riippuen (Azo ym. 2006, 2012). Azo ym. (2012) havaitsivat valkolupiini-viljaseoskasvustoista saatavan parhaan kuiva-aine- ja raakavalkuaissadon, kun kasvusto korjataan valkolupiinin siementen ollessa täysikokoisia ja sisällöltään kiinteitä, mutta vielä pehmeitä (kasvuasteet 5.5–5.7, kts. lupiinin kehitysvaiheet, liite 1). Fraserin ym. (2005) mukaan valkolupiinin kehitysvaihe vaikuttaa satomäärään, sen sijaan rehun kemialliseen koostumukseen sillä on vain vähän vaikutusta. Tämän vuoksi valkolupiinin rehunkorjuupäivän valinnassa tulisi pyrkiä maksimoimaan korjattavan kuiva-ainesadon määrää, jonka kautta myös rehun ravitsemuksellinen arvo on paras mahdollinen. Optimaalisiin lupiinin kasvuaste saavutettiin 16,5 viikon kuluttua kylvöstä. Tutkimuksessa ei kuitenkaan tarkasteltu rehun orgaanisen aineen sulavuutta, joka myös vaikuttaa rehun optimaalisimman korjuuajankohdan valintaan.

Valkolupiinin puhdaskasvustojen säilöntää on tutkittu muutamissa aiemmissä tutkimuksissa (Jones ym. 1999, Bruno-Soares ym. 2005a, 2005b, Fraser ym. 2005,

Borreani ym. 2009). Doležal ym. (2008) ovat tutkineet keltalupiinin puhdaskasvuston säilöntää ja Fychan ym. (2002) sinilupiinin puhdaskasvuston säilöntää. Herrera-Velazcon ym. (2008) säilöntätutkimuksessa selvitettiin maissin oljen lisäämistä lupiinin joukkoon. Kaikissa aiemmissa valkolupiinin ja sinilupiinin säilöntäkokeissa on säilönnässä käytetty biologista säilöntäainetta (Jones ym. 1999, Fychan ym. 2002, Bruno-Soares ym. 2005a, 2005b, Fraser ym. 2005, Herrera-Velazco ym. 2008, Borreani ym. 2009). Säilönnän apuaineina on käytetty myös tanniineja (Bruno-Soares ym. 2005b) ja melassia (Herrera-Velazco ym. 2008). Doležalin ym (2008) keltalupiinikoe on ainoa lupiinin säilöntäkoe, jossa on säilönnässä käytetty happoja (propionihapon, muurahaishapon, bentsoehapon ja ammoniumformiaatin seos). Aiempia tutkimustuloksia valkolupiinin ja viljojen seoskasvustojen säilönnästä ei löytynyt. Myöskään erityyppisiä säilöntäaineita ei ole aiemmin vertailtu valkolupiinin säilönnässä.

Puhtaiden lupiinien säilönnästä saadun tutkimustiedon perusteella lupiini tulisi esikuivattaa hyvissä sääolosuhteissa (Borreani ym. 2009, Doležal ym. 2008) ja säilönnässä tulisi aina käyttää säilöntäainetta (Fraser ym. 2005, Doležal ym. 2008, Borreani ym. 2009). Biologisella säilöntäaineella säilöttyjen lupiinisäilörehujen pH on ollut alempi ja valkuaisen hajoavuus pienempi kuin painorehujen (Jones ym. 1999, Bruno-Soares ym 2005a, 2005b, Fraser ym. 2005, Borreani ym. 2009). Bruno-Soaresin ym. (2005b) kokeessa kaikissa lupiinirehuissa tapahtui voi happokäymistä, Borreanin ym. (2009) tutkimuksessa biologinen säilöntäaine esti voi happokäymisen ja Fraserin ym. (2005) tutkimuksessa kaikissa rehuissa havaittiin vain vähäisiä määriä voi happea, pitoisuuksia ei kuitenkaan ilmoitettu. Jones ym. (1999) ja Fraser ym. (2005) myös havaitsivat biologisella säilöntäaineella säilötyn rehun sokeripitoisuuden olevan korkeampi kuin painorehun. Biologinen säilöntäaine on siis parantanut lupiinisäilörehujen laatua verrattuna ilman säilöntäainetta tehtyyn säilöntään. Rehun laatu ei kuitenkaan ole aina ollut kaikilta osin hyvä suomalaisten laatuvaatimusten mukaan (taulukko 2). Doležal ym. (2008) havaitsivat happoannostustason 6 l/t tuoretta rehua (hapon konsentraatiota ei mainittu) tuottavan keltalupiinin säilönnässä parempilaatuista rehua kuin pienempi happoannostustaso (3 l/t tuoretta rehua) tai painorehu. Isompi happoannostustaso rajoitti kaikkea käymistä, ehkäisi valkuaisen hajoamista tehokkaammin ja säilytti rehun sokeripitoisuuden korkeampana kuin pienempi happoannostustaso. Tämän seurauksena rehun energia-arvo oli parempi suuremmalla happoannostustasolla kuin pienemmällä tasolla tai painorehussa.

Taulukko 2. Aiempien lupiinisäilörehututkimusten säilöntälaatu suomalaisten laatuvaatimusten (MMM 1999) mukaan luokiteltuna.

Tutkimus	Rehu	Maitohappo g/kg	Etikkahappo g/kg	Voihappo g/kg	NH ₄ - N/kok.N g/kg	pH
Jones ym. 1999	PR, esikuivaamaton	-	-	-	Huono	Huono
	LAB, esikuivaamaton	-	-	-	Huono	Hyvä
	PR, esikuivattu	-	-	-	Huono	Huono
	LAB, esikuivattu	-	-	-	Hyvä	Hyvä
Bruno-Soares ym. 2005a	PR, esikuivaamaton	-	-	-	Hyvä	Huono
	LAB, esikuivaamaton	-	Tyydyttävä	-	Hyvä	Hyvä
Bruno-Soares ym. 2005b	PR, esikuivaamaton	-	Tyydyttävä	Huono	Hyvä	Huono
	LAB, esikuivaamaton	-	Tyydyttävä	Huono	Hyvä	Hyvä
	LAB + tanniinit, esikuivaamaton	-	Tyydyttävä	Huono	Hyvä	Hyvä
Fraser ym. 2005	Arthur, K1, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Tyydyttävä	Hyvä
	Arthur, K1, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Arthur, K2, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Huono	Hyvä
	Arthur, K2, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Arthur, K3, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Huono	Hyvä
	Arthur, K3, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Arthur, K4, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Tyydyttävä	Hyvä
	Arthur, K4, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Nelly, K1, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Huono	Hyvä
	Nelly, K1, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Nelly, K2, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Huono	Hyvä
	Nelly, K2, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Nelly, K3, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Huono	Hyvä
	Nelly, K3, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Nelly, K4, PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
	Nelly, K4, LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	Hyvä	Hyvä
Doležal ym. 2008	PR, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	-	Hyvä
	Happo 3 l/t, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	-	Hyvä
	Happo 6 l/t, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	-	-	Hyvä
Borreani ym. 2009	PR, esikuivaamaton	Hyvä	Tyydyttävä	Huono	Huono	Huono
	LAB, esikuivaamaton	Hyvä	Hyvä	Hyvä	Huono	Hyvä
	PR, esikuivattu	Hyvä	Tyydyttävä	Huono	Huono	Hyvä
	LAB, esikuivattu	Hyvä	Hyvä	Hyvä	Huono	Hyvä

PR: painorehu, LAB: biologinen säilöntäaine, Happo: propionihapon, muurahaishapon, bentsoehapon ja ammoniumformiaatin seos, Arthur/Nelly: lajike, K1–K4: kasvuaste, - : pitoisuutta ei ilmoitettu

Maitohappo, hyvä: <25,0 g/kg; etikkahappo, hyvä: <6,0 g/kg, tyydyttävä: <10,0 g/kg; voihiappo, hyvä: <1,0 g/kg; NH₄-N/kok.N, hyvä: <80 g/kg, tyydyttävä: <120 g/kg; pH, hyvä: <4,20

2.4 Valkolupiinin haitta-aineet

Palkokasveissa esiintyy useita eri sekundäärisiä metaboliitteja, jotka sekä puolustavat kasvia kasvinsyöjiä ja mikrobeja vastaan, että toimivat myös signaaliyhdisteinä, jotka

houkuttelevat pölyttäviä ja siemeniä levittäviä eläimiä. Typensitojakasveina palkokasveissa on enemmän tyypeä sisältäviä sekundäärisiä metaboliitteja kuin muissa kasveissa. Tyypipitoisia sekundäärisiä metaboliitteja ovat alkaloidit, amiinit, ei-valkuaispitoiset aminohapot, syanogeeniset glukosidit ja peptidit. Tyypeä sisältämättömiä sekundäärisiä metaboliitteja ovat fenolit, polyketidit ja terpenoidit. (Wink 2013). Valkolupiinin siemenet eivät sisällä proteaasi-inhibiittoreita, lektiinejä, tanniineja eivätkä (poly-)fenoliyhdisteitä (Huisman ym. 1990). Muista palkokasveista poiketen myös valkolupiinin siementen fytiinihappopitoisuuden on raportoitu olevan pieni (Saastamoinen ym. 2012).

Lupiinin sisältämät haitta-aineet ovat pääasiassa alkaloideja ja α -galaktosideja. α -galaktosidit ovat oligosakkarideja, jotka eivät sula suolistossa ja ovat sen vuoksi paksusuolen bakteerifermentaation käytettävissä. Tämän toiminnan tuloksena suolistossa muodostuu kaasua. Palkokasvien siemenistä lupiinit sisältävät eniten α -galaktosideja. (Guillon ja Champ 2002). Valkolupiinin siementen α -galaktosidipitoisuuden on raportoitu olevan keskimäärin 86,5 g/kg ka (Trugo ja Almeida 1988). Alkaloidit ovat emäksisiä orgaanisia yhdisteitä, joista monet ovat myrkyllisiä eläimille ja ihmisille. Niiden vaikutus kohdistuu erityisesti eläinten hermostoon. Ne häiritsevät solutasolla mm. solukalvojen kuljetustehtäviä, ärsytystilan välittymistä solusta toiseen, proteiinisynteesiä, entsyymien aktiivisuutta ja solunjakautumista. (Tirri ym. 2006).

Valkolupiinista on olemassa sekä makeita lajikkeita, joiden alkaloidipitoisuus on pieni (mm. WTD, siementen alkaloidipitoisuus 0,58 g/kg ka), että karvaita lajikkeita, joiden alkaloidipitoisuus on jopa 50 kertaa makeita lajikkeita korkeampi (mm. Bac, siementen alkaloidipitoisuus 29,6 g/kg ka) (Aniszewski ym. 2001). Lupiinien matala alkaloidipitoisuus ei kuitenkaan korreloi matalan oligosakkaridipitoisuuden kanssa. Alkaloidipitoisuudeltaan matalien lupiinilajikkeiden oligosakkaridipitoisuus voi olla samalla tasolla alkaloidipitoisuudeltaan korkeiden lajikkeiden kanssa. Alkaloidipitoisuudeltaan matalissa lajikkeissa oligosakkaridit muodostavatkin suuremman haitan ruoansulatukselle kuin alkaloidit. (Zdunczyk ym. 1998).

2.5 Lupiinisäilörehu nautojen ruokinnassa

Lupiinisäilörehun käyttöä nautojen ruokinnassa on tutkittu kolmessa tutkimuksessa (Murphy ym. 1993, Kochapakdee ym. 2002, Dawson 2012). Näistä Dawsonin (2012) tutkimus tehtiin keltalupiinin ja ruisvehnän seoksella ja muut valkolupiinilla. Dawsonin

(2012) tutkimuksessa käytetty lupiini-ruisvehnäkokoviljasäilörehu oli säilötty biologisella säilöntäaineella ja sen säilöntälaatu oli huono: pH oli korkea (pH 4,7–5,0), ammoniumtypen osuus oli suuri (173–182 g/kg kok. N) ja maitohapon määrä oli pieni (9 g/kg ka). Lupiini-ruisvehnäseos syötettiin yhdessä hyvälaatuisen nurmisäilörehun kanssa (suhde 40:60) ja sitä verrattiin puhtaaseen nurmisäilörehuun ja nurmisäilörehun ja maissisäilörehun seokseen. Lupiinisäilörehun huonosta laadusta huolimatta käytetty karkearehu ei vaikuttanut loppukasvatusvaiheessa olevien lihanautojen elopainoon, elo- ja teuraspainon kasvuun, karkearehun syöntiin, kokonaissyöntiin eikä rehuhyötysuhteeseen. Vaikutusta ei myöskään havaittu ruhon koostumukseen eikä lihan laatuun.

Murphyn ym. (1993) tutkimuksessa käytettiin säilöntälaadultaan hyvää valkolupiinisäilörehua, jota verrattiin nurmisäilörehuun lihanautojen ruokinnassa. Väkirehuna käytettiin ohraa tai perunaa. Käytetty karkearehu ei vaikuttanut lihanautojen kasvuun, teuraspainoon, rasvaisuuteen, kuiva-aineen syöntiin eikä rehuhyötysuhteeseen. Nylonpussimenetelmällä määritetyssä kuiva-aineen sulavuudessa ei ollut eroa karkearehujen välillä. Sen sijaan lupiinisäilörehun typen hajoavuus oli nopeampaa kuin nurmisäilörehun (0,245 vs. 0,104 h⁻¹). Nurmisäilörehun pötsihajoavuus oli myös pienempi kuin lupiinisäilörehun.

Kochapakdeen ym. (2002) tutkimuksessa verrattiin valkolupiinista, lauhkean vyöhykkeen maissista, trooppisesta maissista ja hybridihelmihirssistä tehtyä säilörehua lypsylehmien ruokinnassa. Lupiinisäilörehu alensi syöntiä, maito- ja valkuaistuotosta, lehmien nettoenergiatasetta ja pötsin pH:ta lauhkean vyöhykkeen maissisäilörehuun verrattuna. Vaikutusta ei havaittu maidon rasva- ja valkuaispitoisuuteen, rasvatuotokseen, energiakorjattuun maitotuotokseen, elopainoon, plasman ja maidon ureapitoisuuteen eikä pötsin VFA-määrään. Valkolupiinisäilörehun kuiva-aineen, orgaanisen aineen, raakavalkuaisen, happodetergenttikuidun (ADF) ja neutraalidetergenttikuidun (NDF) näennäiset sulavuudet olivat suuremmat kuin lauhkean vyöhykkeen maissin. Valkolupiinin *in situ* -sulavuudet olivat lauhkean vyöhykkeen maissisäilörehua suuremmat ADF:n ja NDF:n osalta.

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Valkolupiinin soveltuvuutta kokoviljasäilörehun raaka-aineeksi ei ole aiemmin tutkittu Suomen olosuhteissa ja ulkomainenkin tutkimustieto valkolupiini-vehnäkokoviljasäilörehusta on vähäistä. Uuden kasvilajin käyttö edellyttää tietoa kasvuston koostumuksesta, sulavuudesta ja säilöttävyydestä kasvukauden eri vaiheissa. Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää mahdollisuuksia käyttää valkolupiinia kokoviljasäilörehun raaka-aineena. Tavoitteena on selvittää, missä vaiheessa valkolupiinin ja vehnän seoskasvusto tulisi korjata säilörehuksi ja millaisilla rehuseossuhteilla ja säilöntäainekäsittelyillä saadaan hyvälaatuisinta rehua aikaiseksi.

Tämän tutkimuksen tutkimushypoteesit ovat:

1. Kehitysvaihe ja kasvilajien seossuhde vaikuttaa rehulaatuun
2. Säilönnässä tarvitaan säilöntäainetta hyvälaatuisen säilörehun tuottamiseksi
3. Kemiallisten säilöntäaineiden toimintavarmuus on parempi kuin biologisen säilöntäaineen
4. Kemiallisten säilöntäaineiden vaikutuksissa rehun laatuun ei ole eroa

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Koerehujen valmistus

Tutkimus tehtiin Helsingin yliopiston Maataloustieteiden laitoksella. Koerehut valmistettiin kesällä 2012 Viikin opetus- ja tutkimustilan Museopellon lohkolta. Lohkolle oli kylvetty 10.5.2012 kolme 100 m²:n suuruista koealaa:

- 1) Valkolupiini Ludic, kylvötiheys: siemeniä 60–70 kpl/m² (puhdas lupiinikasvusto)
- 2) Valkolupiini Ludic + kevätvehnä Amaretto, kylvötiheys: lupiinin siemeniä 36 kpl/m² + vehnän siemeniä 360 kpl/m² (Amaretto-kasvusto)
- 3) Valkolupiini Ludic + kevätvehnä Quarna, kylvötiheys: lupiinin siemeniä 36 kpl/m² + vehnän siemeniä 360 kpl/m² (Quarna-kasvusto).

Amaretto-kevätvehnän kasvu aika on virallisissa lajikekokeissa ollut 105,2 päivää ja Quarnan 101,6 päivää (Kangas ym. 2011). Vilja-lupiiniseoksille (Amaretto- ja Quarna-kasvustot) annettiin kylvön yhteydessä typpeä 60 kg/ha. Lupiinin puhdaskasvustolle annettiin typpeä 10 kg/ha ja kaliumia 70 kg/ha. Koeala oli runsasmultaista hiuesavea ja maan pH oli hyvä (taulukko 3).

Taulukko 3. Museopellon koealan viljavuustutkimustiedot ja maan viljavuusluokat. Tiedot vuodelta 2009.

	Arvo	Viljavuusluokka
Pintamaan maalaji	HeS	
Multavuus	rm	
Johtoluku, 10xmS/cm	1,3	
Happamuus, pH	6,4	Hyvä
Kalsium (Ca), mg/l	2750	Hyvä
Fosfori (P), mg/l	8,85	Tyydyttävä
Kalium (K), mg/l	250	Tyydyttävä
Magnesium (Mg), mg/l	245	Tyydyttävä
Rikki (S), mg/l	26,4	Hyvä
Kupari (Cu), mg/l	20	Korkea/arveluttavan korkea
Mangaani (Mn), mg/l	<3	Huono
Sinkki (Zn), mg/l	6,27	Hyvä

Alkukesän 2012 sää oli viileä ja melko sateinen. Terminen kasvukausi (vuorokauden keskilämpötila yli +5 °C) alkoi Etelä-Suomessa 21.4.2012 ja päättyi 21.10.2012. Kesä–

elokuun keskilämpötila oli yli 15 °C, mikä poikkesi vertailukaudesta 1981–2010 - 0,5–0,0 °C. Hellepäivien määrä jäi kuitenkin koko maassa alle puoleen normaalista. Kesä–elokuun sademäärä oli Etelä-Suomessa 160–200 mm, mikä oli 80–95 % vertailukauden 1981–2010 kesien sademäärästä. (Ilmatieteen laitos 2013).

Kaikkien koekasvustojen kehitys oli myöhemmässä kuin normaalisti. Puhtaan valkolupiinikasvuston kehitys oli epätasaista. Tämän vuoksi siitä ei saatu riittävästi raaka-ainetta kokeeseen ja puhdaskasvusto päätettiin poistaa kokeesta. Koerehujen valmistukseen käytettiin Amaretto-kasvustoa, jonka valinta tehtiin kasvustojen kehityksen perusteella. Lisäksi Amaretto-vehnä sopi pidemmän kasvuaikansa perusteella Quarna-vehnää paremmin seoskasviksi valkolupiinin kanssa. Koerehut tehtiin kahdessa kehitysvaiheessa 13. ja 27.8.2012 (kasvuasteet 1 ja 2; K1 ja K2), 13,5 ja 15,5 viikkoa (96 ja 110 päivää) kylvön jälkeen. Molempien lajikkeiden kasvustojen kehitystä seurattiin vielä rehuntekojen jälkeenkin. Kasvuasteella 1 vehnä oli taikinatuleentumisen alussa ja valkolupiinin palot olivat vihreitä ja siemenet täyttivät 50 % palkojen väliseinien välisestä tilasta (kasvuvaihe 4.2, kts. lupiinin kasvuvaiheet, liite 1). Kasvuasteella 2 vehnä oli taikinatuleentumisen lopussa ja valkolupiinin siemenet täyttivät 75 % palkojen väliseinien välisestä tilasta (kasvuvaihe 4.3). Kasvuasteella 3 kasvien kasvuvaihetta ei määritetty. Valkolupiinissa oli kukintoja vielä kolmannellakin kasvuasteella. Ennen niittoa kasvuston korkeus mitattiin 5–10 kohdasta (jäljellä olevan kasvuston määrästä riippuen) ja kasvusto valokuvattiin.

Ensimmäisenä korjuupäivänä ja sitä edeltävinä päivinä sää oli lämmin ja aurinkoinen. Niitettäessä lämpötila oli noin 20–25 °C. Toista korjuuta edelsi runsas sadekuuro ja lämpötila oli ensimmäistä kertaa viileämpi (15–20 °C).

Kasvustot niitettiin sähkösaksilla ja sirpillä, niittokorkeus oli noin 8 cm. Tarvittava Amaretto-kasvuston niittomäärä oli yhteensä noin 40–50 kg. Kasvuston kasvilajien osuus määräsi tarkan niittomäärän, sillä sekä vehnää että lupiinia oli oltava riittävästi koetta varten. Niitetty pinta-ala mitattiin satomäärän laskentaa varten. Amaretto-kasvuston niittoala ensimmäisellä rehuntekokerralla 13.8.2012 (kasvuaste 1) oli 17,2 m² ja toisella rehuntekokerralla 27.8.2012 (kasvuaste 2) 13,3 m².

Niitetyistä kasvustoista eroteltiin lupiini, vehnä ja rikkakasvit ja punnittiin näiden kokonaismäärät. Kasvilajit silputtiin erikseen näytesilppurilla (Wintersteigner®, Ried im Innkreis, Itävalta). Säilöntää varten muodostettiin silputusta Amaretto-kasvuston vehnästä ja valkolupiinista kaksi erilaista seosta, joissa seossuhde tuorepainosta oli:

Seos 1 (S1): 1/3 valkolupiinia + 2/3 vehnää

Seos 2 (S2): 2/3 valkolupiinia + 1/3 vehnää.

Molempien raaka-aineseosten valmistus tehtiin neljässä kuuden kilon erässä. Seoksen 1 eriin tuli 2 kg lupiinia ja 4 kg vehnää, seoksen 2 eriin puolestaan 4 kg lupiinia ja 2 kg vehnää.

Kokeessa oli neljä erilaista säilöntäainekäsittelyä. Käsittelyt olivat painorehu (PR), muurahaishappo (MH), heksametyleenitetra-amiinin (myöhemmin: heksamiini) ($C_6H_{12}N_4$) ja natriumnitriitin ($NaNO_2$) seos (NaHe) ja biologinen säilöntäaine (LAB) (taulukko 4). Kaikki säilöntäaineet laimennettiin vedellä siten, että jokaisessa käsittelyssä annostus oli yhteensä 10 ml/kg. Painorehuun lisättiin pelkkä vesi. Raaka-aineseokset levitettiin muovin päälle ja niihin suihkutettiin välittömästi suihkupullosta säilöntäaine useassa erässä. Rehumassaa sekoitettiin huolellisesti säilöntäaineen lisäyksen aikana ja sen jälkeen. Raaka-aineen kanssa kosketuksissa olevat astiat ja välineet puhdistettiin 70 % etanolilla. Rehujen valmistuksessa käytettiin kertakäyttöhansikkaita ihomikrobikontaminaation välttämiseksi.

Taulukko 4. Säilöntäainekäsittelyt.

Käsittely	Lyhenne	Säilöntäaine/DSM No	Kauppanimi	Annostustaso
Painorehu (kontrolli)	PR			
Muurahaishappo	MH	80 % CH_2O_2		4 l/1000kg ¹ rehua
Heksamiinin ja natriumnitriitin seos	NaHe	≤16,5 % $C_6H_{12}N_4$ (heksametyleenitetra-amiini) ≤25 % $NaNO_2$ (natriumnitriitti)	Agrosil Liquid	2,5 l/1000kg rehua, heksamiini 500 g/1000 kg rehua, natriumnitriitti 750 g/1000 kg rehua
Biologinen säilöntäaine	LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> /3676 <i>Lactobacillus plantarum</i> /3677	Agrosil Premium	1x10 ⁶ pmy/g rehua

¹ 100 % happona ilmaistuna

pmy: pesäkkeitä muodostavaa yksikköä

Koerehut tehtiin 1,5 litran lasisiin laboratoriosiiloihin (Weck[®], Wher-Oflingen, Saksa), jotka punnittiin (ilman kantta ja tiivistettä) ja numeroitiin etukäteen. Jokaisesta neljästä säilöntäainekäsittelystä tehtiin kolme rinnakkaista siiloa, eli yhteensä 12 siiloa/rehuseos. Näin ollen siiloja oli yhteensä 24 kpl/kasvuaste ja koko kokeessa 48 kpl. Siilot täytettiin siten, että samaa seosta tuli jokaiseen siiloon sama määrä tuoreena. Lupiinivaltaisempaa seosta (seos 2) punnittiin siiloihin enemmän sen suuremman kosteuspitoisuuden vuoksi. Täyttömäärät olivat:

Kasvuaste 1, seos 1 (K1S1): 850,0 g, rehun tiiviys 567 kg/m³; 176 kg ka/m³

Kasvuaste 1, seos 2 (K1S2): 950,0 g, rehun tiiviys 633 kg/m³; 151 kg ka/m³

Kasvuaste 2, seos 1 (K2S1): 750,0 g, rehun tiiviys 500 kg/m³; 150 kg ka/m³

Kasvuaste 2, seos 2 (K2S2): 900,0 g, rehun tiiviys 600 kg/m³; 133 kg ka/m³

Siilot tiivistettiin täyttönuijien avulla ja suljettiin kumitiivistein, lasikannen ja kiinnityspidikkeiden avulla. Siilot säilytettiin pimeässä kaapissa tasaisessa huoneenlämpötilassa (20 °C) ennen avaamista. Huoneen lämpötilaa seurattiin säännöllisesti.

Siilot avattiin 20.11.2012 (kasvuaste 1) ja 4.12.2012 (kasvuaste 2), 100 ja 101 päivän säilönnän jälkeen. Siilojen avauksen jälkeen siilot punnittiin välittömästi ilman kantta ja tiivistettä. Punnitustulosten perusteella laskettiin säilönnän aikana tapahtuneet tuorepaino- ja kuiva-ainetappiot. Osa siilojen rehusisällöstä käytettiin aerobisen stabiilisuuden määrittämiseen, osasta tehtiin heti pH-määritys ja osa pakastettiin erikoisanalyysijä varten. Lisäksi otettiin näyte mikrobiologisia määrytyksiä varten.

4.2 Aerobinen stabiilisuus

Aerobinen stabiilisuus määritettiin seuraamalla rehun lämpötilan muutosta sen joutuessa ilman vaikutuksen alaiseksi. Siilojen avauksen yhteydessä otettiin näyte, joka sijoitettiin muovipussissa välittömästi styrox-laatikkoon. Ilma pääsi rehuun laatikon kannessa ja pohjassa olevien aukkojen ja pussin suuaukon ja pussin pohjassa olleen reiän kautta. Laatikko sijoitettiin kasvatuskaappiin, jonka lämpötila pidettiin mahdollisimman vakiona 20 °C. Näytteen lämpötilan kehitystä seurattiin näytteen keskikohtaan sijoitetun data loggerin (MircoLite, Fourier Systems Ltd.) avulla 13 päivän ajan. Lämpötila rekisteröitiin 15 minuutin välein. Samalla mitattiin kasvatuskaapin lämpötila. Aerobisen stabiilisuuden mittaus aloitettiin heti rehujen altistuttua hapekkaille olosuhteille. Jokaisesta siilosta tehtiin yksi

aerobisen stabiilisuuden määrittäminen. Tiedot lämpötilan kehityksestä purettiin tietokoneelle suoraan data loggerista USB-portin kautta. Koska data loggereiden välillä havaittiin tasoero niiden mittaamissa lämpötiloissa, lämmenneiden siilojen lämpötilakäyrät skaalattiin vastaamaan kasvatuskaapin lämpötilaa rehujen lämpötilojen tasaannuttua kasvatuskaappiin laittamisen jälkeen. Lämpenemättömien siilojen osalta skaalausta ei tehty.

4.3 Näytteiden otto ja analysointi

4.3.1 Raaka-aine- ja kehitysastenäytteet

Silputusta Amaretto-kasvuston vehnästä ja valkolupiinista otettiin raaka-ainenäyte (n. 2–3 kg) ennen säilöntäainekäsittelyä ja siilojen täyttöä. Quarna-kasvustosta otettiin kehitysastenäytteet Amaretto-kasvuston korjuun yhteydessä (13. ja 27.8.2012; kasvuasteet 1 ja 2). Näiden lisäksi otettiin ylimääräinen kehitysastenäyte 6.9.2012 (kasvuaste 3) (17 viikkoa/120 päivää kylvöstä) molemmista kasvustoista (Amaretto ja Quarna). Kehitysastenäytteet otettiin jokaisesta kasvustosta 2 m²:n alalta. Kehitysastenäytteet niitettiin, lajiteltiin ja punnittiin samoin kuin Amaretto-kasvuston korjuun yhteydessä tehtiin. Quarna- ja Amaretto-kasvustojen kasvuasteen 3 satotaso laskettiin kehitysastenäytteiden perusteella.

4.3.2 Fraktiointi

Molemmista kasvustoista ja kaikilla kasvuasteilla otettiin niiton ja lajittelun jälkeen vehnästä ja lupiinista näytteeksi kokonaisia kasveja fraktiointia varten 0,5–1,5 kg verran. Näistä eroteltiin tähkä tai palko ja varsi tai korsi. Valkolupiinista erotettiin palkofraktioon vain yli 2 cm:n pituiset palot. Fraktioiden määrät punnittiin ja silputtiin, palot ja tähkät käsin saksilla ja varret ja korret näytesilppurilla (Wintersteigner®, Ried im Innkreis, Itävalta). Fraktioiduista kasveista määritettiin tähkän/palon ja varren/korren osuus sekä niiden kuiva-ainepitoisuus.

4.3.3 Analyysit

Rehut analysoitiin Helsingin yliopiston Maataloustieteiden laitoksella ja Saksassa (Central Laboratory of the Faculty of Agriculture and Horticulture of Humboldt University Berlin) syksyjen 2012 ja 2013 välisenä aikana. Tässä maisterintutkielmassa raportoiduista tuloksista raaka-aineiden kuiva-aine, pH, tuhka, typpi, liukoinen typpi, vesiliukoiset

hiilihydraatit (myöhemmin: sokeri), tärkkelys, puskurikapasiteetti ja *in vitro* -sulavuus on määritetty Suomessa. Suomessa analysoitiin lisäksi säilörehun kuiva-aine, pH, tuhka, kokonaistyyppi ja ammoniumtyppi. Säilörehujen maitohappo, vesiliukoiset hiilihydraatit (myöhemmin: sokeri), haihtuvat rasvahapot ja alkoholit puolestaan analysoitiin Saksassa.

Primäärinen kuiva-aine määritettiin sekä rehuraaka-aineista että valmiista säilörehuista siilojen avaamisen jälkeen. Määrittäminen tehtiin kuivaamalla näytteitä lämpökaapissa 103 °C:ssa 20–24 h ajan. Lisäksi raaka-ainenäytteistä tehtiin analyysinäyte kuivaamalla näytettä lämpökaapissa 103 °C lämpötilassa tunnin ajan. Tämän jälkeen loppukuivaus suoritettiin kuivaamalla näytettä 50 °C:ssa kahden vuorokauden ajan. Säilörehun kuiva-aine korjattiin haihtuvien aineosien pitoisuuksien avulla käyttäen yhtälöä:

$$DM_c = DM_n + (1,05 - 0,059 \text{ pH}) \text{ FA} + 0,08 \text{ LA} + 0,77 \text{ PD} + 0,87 \text{ BD} + 1,00 \text{ AL},$$

jossa DM_c on korjattu kuiva-aine, DM_n on korjaamaton kuiva-aine, FA on haihtuvien rasvahappojen summa (C_2 – C_6), LA on maitohappo, PD on 1,2-propaanidioli, BD on 2,3-butaanidioli ja AL on muiden alkoholien summa (C_1 – C_4) (Weissbach ja Strubelt 2008). Raaka-aineen kuivatusta näytteestä määritettiin sekundäärinen kuiva-aine, tuhka, neutraalidetergenttikuitu (NDF), tärkkelys ja *in vitro* -sulavuus.

Kuivatun analyysinäytteen sekundäärinen kuiva-aine määritettiin kuivaamalla näytettä 103 °C lämpötilassa 20–24 h ajan. Tuhkapitoisuus määritettiin polttamalla näytettä muhveliuunissa 600 °C lämpötilassa 16 h ajan. NDF-pitoisuus määritettiin van Soestin ym. (1991) menetelmällä. Määrittämisessä käytettiin amylaasi-entsyymiä ja kuuma- ja kylmäuuttolaitteella varustettua kuituanalysointilaitetta (Tecator Fibertec System 1020 hot extractor ja 1021 cold extractor, Foss, Hilleroed, Tanska). NDF-tulokset ilmaistiin jäännöstuhkan kanssa. Raaka-aineen tärkkelyspitoisuus määritettiin Salon ja Salmen (1968) mukaan. Rehuraaka-aineiden sulavuus (D-arvo) määritettiin *in vitro* -sellulaasimenetelmällä (Friedel 1990) Nousiainen ym. (2003) muunnelmia käyttäen. Tulokset muunnettiin *in vivo* -sulavuudeksi käyttämällä puna-apilan 1. sadon korjausyhtälöä, joka perustuu suomalaisiin *in vivo* -sulavuuskokeisiin (Huhtanen ym. 2006). Kokonaistyyppi ja liukoinen tyyppi määritettiin Kjeldahlin menetelmällä (AOAC 1995). Määrittämisessä käytettiin automaattista tisluslaitetta (Tecator 1028 Distilling Unit, Nordion instruments Ltd, Helsinki, Suomi). Katalysaattorina käytettiin kuparisulfaattia ja kaliumsulfaattia. Raakavalkuaispitoisuus laskettiin kertomalla määritetty kokonaistypen pitoisuus luvulla 6,25. Raaka-aineen vesiliukoiset hiilihydraatit määritettiin Suomessa

spektrofotometrillä (UVmini-1240, Shimadzu Corporation, Japani) (Somogyi 1945, Salo 1965). Raaka-aineen puskurikapasiteetti määritettiin Weissbachin (1992) menetelmällä ja sitä varten näytteet kylmäkuivattiin (Christ Beta 2-8 LD Plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Saksa).

pH määritettiin kalibroidulla pH-elektrodilla (Mikroprozessor-pH-Meter 761, Knick, Saksa) raaka-aineesta säilöntäainekäsittelyiden jälkeen ennen silojen täyttöä sekä säilörehusta välittömästi silojen avaamisen jälkeen. Ammoniumtyppi määritettiin spektrofotometrillä (UVmini-1240, Shimadzu Corporation, Japani) McCulloughin (1967) menetelmällä. Natriumnitriitti-heksametyleenitetramiinilla säilötyille rehuille laskettiin kokonaistypen ja ammoniumtypen korjatut pitoisuudet, jotka laskettiin vähentämällä määritetystä pitoisuudesta säilöntäaineessa lisätty typpi (0,042 %).

Säilörehujen vesiliukoiset hiilihydraatit analysoitiin Saksassa antronimenetelmällä (Lengerken ja Zimmermann 1991). Maitohappo analysoitiin nestekromatografisesti (HPLC, SHIMADZU, Prominence LC-20AD, RI-Detektor) Weiss:n ja Kaiserin (1996) menetelmällä. Haihtuvat rasvahapot (etikka-, propioni-, isovoi-, voi-, isovaleriaana-, valeriaana- ja kapronihappo), alkoholit (metanoli, etanoli, propanoli, butanoli, 1,2-propaanidioli ja 2,3-butaanidioli) ja asetoni määritettiin kaasukromatografilla (FA Shimadzu GC 2010 AF) Weiss:n (2001) mukaan.

Raaka-aineen mikrobiologinen koostumus määritettiin QuantiFire Ltd.:n toimesta (Espoo, Suomi). Näytteet esikäsiteltiin probidium monoatsidilla (PMA) elävien ja kuolleiden bakteerisolujen erottamiseksi, lisäksi näytteen solurakenteita rikottiin fyysisellä, entsyymaattisella ja kemiallisella käsittelyllä. DNA saostettiin isopropanolilla. Mikrobi-DNA monistettiin kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (qPCR) ja tunnistettiin fluoresenssin (SybrGreen) avulla. Rehunäytteessä havaittujen mikrobien määrät muunnettiin kymmenkantaiksi logaritmeiksi.

4.4 Tulosten laskenta ja tilastolliset analyysit

Säilörehujen fermentaatiokerroin laskettiin yhtälöllä:

$$FC = DM (\%) + 8 WSC/BC,$$

jossa FC on fermentaatiokerroin, DM on kuiva-ainepitoisuus prosentteina, WSC on vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus ja BC on rehun puskurikapasiteetti (Schmidt ym. 1971).

Raaka-aineen D-arvo laskettiin yhtälöllä:

D-arvo = orgaanisen aineen pitoisuus \times orgaanisen aineen sulavuus

Orgaanisen aineen sulavuuden laskentakaavat:

Puna-apila: $0,003 + 0,93 \times \text{OMS}$

Kokoviljasäilörehu: $0,290 + 0,52 \times \text{OMS}$

Yleiskaava kaikille rehuille: $0,040 \times 0,89 \times \text{OMS}$,

joissa OMS on orgaanisen aineen sellulaasiliukoisuus (kg/kg). (Huhtanen ym. 2006).

Vehnän D-arvo laskettiin kokoviljasäilörehun laskentakaavalla. Valkolupiinin D-arvo laskettiin sekä puna-apilan laskentakaavalla että yleiskaavalla, jotta voitiin nähdä laskentakaavan vaikutus lupiinin sulavuusarvoon. Seosten D-arvo laskettiin valkolupiinin (puna-apilan laskentakaava) ja vehnän D-arvojen painotettujen keskiarvojen avulla.

Raaka-aineen energia-arvo (muuntokelpoinen energia) laskettiin kokoviljasäilörehun laskentakaavalla:

ME (MJ) = $0,0155 \times \text{D-arvo}$ (MTT 2013)

Tulokset testattiin tilastollisesti varianssianalyysillä käyttäen SAS 9.3:n mixed proseduuria. Testissä selvitettiin säilöntäainekäsittelyn vaikutus säilörehun käymislaatuun ja tuoretappioihin. Tilastollisena mallina käytettiin yhtälöä $Y = \mu_i + \alpha_j + e_{ijk}$, jossa Y on havainto, μ on yleiskeskisarvo, α on säilöntäaineen vaikutus ja e virhetermi. Hajonnan kuvaajana käytettiin keskiarvon keskivirhettä (SEM). Säilöntäainekäsittelyn neliösumma jaettiin ortogonaalisiin kontrasteihin seuraavasti:

- 1) painorehun ja säilöntäainekäsiteltyjen rehujen ero, PR vs. muut
- 2) biologisella säilöntäaineella käsitellyn rehun ero muilla säilöntäaineilla käsiteltyihin rehuihin, LAB vs. MH ja NaHe
- 3) muurahaishapolla käsitellyn rehun ero natriumnitriitillä ja heksamiinilla käsiteltyyn rehuun, MH vs. NaHe

Testaus tehtiin neljässä osassa, jokainen valmistettu seos testattiin erikseen. Säilörehun laatuparametrien jakaumien normalisuus ja varianssien homogeenisuus tarkastettiin mallin tuottamien residuaalien jakaumasta. Kaikki testatut laatuparametrit eivät olleet normaalijakautuneita. Näille muuttujille tehtiin logaritmimuunnos ja ne testattiin uudelleen varianssianalyysillä. Muuttujat eivät olleet normaalijakautuneita tämänkään jälkeen, jonka vuoksi ne testattiin ei-parametrisellä testillä (Kruskal-Wallis, yksisuuntainen varianssianalyysi) käyttäen SPSS:ää (IBM SPSS Statistics, versio 21). Käsittelyiden erot testattiin parittaisella keskiarvotestillä.

Merkitsevyydet ilmaistiin P-arvoina, joissa $P < 0,001$ = erittäin merkitsevä, $P < 0,01$ = hyvin merkitsevä, $P < 0,05$ = merkitsevä ja $P < 0,10$ = suuntaa antava. Tämän lisäksi taulukoissa parivertailujen keskiarvojen välinen ero on ilmaistu kirjaimilla (a,b), niin että jos säilöntäainekäsittelyiden välillä on ero ($P < 0,05$), ne on ilmaistu eri kirjaimin.

5 TULOKSET

5.1 Satotiedot

Lupiinin osuus seoskasvustosta lisääntyi kasvukauden edetessä. Rehua tehtäessä (kasvuasteet 1 ja 2) lupiini oli vielä kasvuvaiheessa. Sen sijaan vehnän pituuskasvu oli päättynyt. Valkolupiinin osuus oli kaikilla kasvuasteilla Quarna-kasvustossa suurempi kuin Amaretto-kasvustossa ja ero lisääntyi kasvukauden edetessä. Amaretto-kasvuston kuiva-ainesadon määrä oli suurimmillaan kasvuasteella 2 (11 101 kg ka/ha). Quarna-kasvuston kasvuasteen 2 kuiva-ainesadon määrä oli huomattavasti kahta muuta kasvuastetta pienempi. (Taulukko 5). Rikkojen osuus tuoreesta koko kasvustosta vaihteli välillä 4,44–13,4 %.

Taulukko 5. Kasvustojen korkeudet, osuudet koko kasvustosta ja satotiedot kasvuasteittain ja kasvustottain.

	Amaretto		Quarna	
	Valkolupiini	Vehnä	Valkolupiini	Vehnä
Kasvuaste 1				
Korkeus, cm	111	92	92	83
Osuus, % ka ¹	23,2	76,8	25,3	74,7
Sato, kg/ha	33104		32170	
Sato, kg ka/ha	10106		10104	
RV-sato, kg/ha ²	983			
ME-sato, MJ/ha ³	92379			
Kasvuaste 2				
Korkeus, cm	114	92	125	85
Osuus, % ka ¹	28,8	71,2	40,4	59,6
Sato, kg/ha	41173		32423	
Sato, kg ka/ha	11101		8959	
RV-sato, kg/ha ²	1064			
ME-sato, MJ/ha ³	101230			
Kasvuaste 3				
Korkeus, cm	117	91	128	84
Osuus, % ka ¹	32,8	67,2	45,2	54,8
Sato, kg/ha	31380		39933	
Sato, kg ka/ha	10211		10569	
RV-sato, kg/ha ²	987			
ME-sato, MJ/ha ³	92274			

¹ Koko kasvustosta ilman rikkoja

² Raakavalkuaissato

³ Muuntokelpoisen energian sato. Laskenta perustuu puna-apilan kaavalla laskettuun valkolupiinin D-arvoon ja kokoviljasäilörehun kaavalla laskettuun vehnän D-arvoon

5.2 Fraktioinnit

Valkolupiinin palkojen kuiva-ainepitoisuus oli noin 100 kg/kg ka ja siinä havaittiin vain vähän vaihtelua lajikkeiden ja kasvuasteiden välillä. Kevätvehnän tähkien kuiva-ainepitoisuus lisääntyi kasvukauden edetessä. Quarnan-vehnän korren kuiva-ainepitoisuus lisääntyi kasvukauden edetessä. Valkolupiinin palkojen osuus koko kasvista oli suurin Quarna-kasvustossa kasvuasteella 3 (16,0 % kuiva-aineesta), Amaretto-kasvustossa palkojen osuus oli suurimmillaan kasvuasteella 2 (13,9 % kuiva-aineesta). Vehnän tähkien osuus koko kasvista lisääntyi kasvuasteeseen 2 asti, jonka jälkeen osuudet kääntyivät laskuun. (Taulukko 6).

Taulukko 6. Kasvien fraktioiden kuiva-ainepitoisuus ja tähkän/palon osuus koko kasvista

Kasvuaste	Kasvusto	Kasvilaji	Tähkä/palko	Korsi/varsi	Tähkän/palon osuus % ka:sta
			Kuiva-aine g/kg	Kuiva-aine g/kg	
1	Amaretto	Vehnä	457	362	49,1
		Valkolupiini	109	175	5,94
2	Amaretto	Vehnä	490	319	61,6
		Valkolupiini	95,0	167	13,9
3	Amaretto	Vehnä	757	523	51,3
		Valkolupiini	99,4	184	13,7
1	Quarna	Vehnä	475	371	54,4
		Valkolupiini	109	192	9,16
2	Quarna	Vehnä	599	412	57,6
		Valkolupiini	103	175	7,82
3	Quarna	Vehnä	726	529	50,8
		Valkolupiini	94,6	179	16,0

5.3 Säilörehun raaka-aineen koostumus

Vehnän kuiva-ainepitoisuudessa ei tapahtunut muutoksia kahdessa ensimmäisessä kasvuasteessa. Sen sijaan kolmannessa kasvuasteessa kuiva-ainepitoisuus oli voimakkaasti lisääntynyt. Valkolupiinin kuiva-ainepitoisuus oli selvästi vehnää pienempi kaikissa kasvuasteissa, valkolupiini oli märintä kasvuasteella 2. (Taulukko 7).

Molempien kasvilajien tuhkapitoisuus pieneni kasvuston vanhetessa. Valkolupiinin tuhkapitoisuus oli vehnää pienempi kaikissa kasvuasteissa. Kuitenkin valkolupiinin tuhkapitoisuudessa tapahtuneet muutokset olivat pienempiä kuin vehnän. Myös

molempien kasvilajien raakavalkuaispitoisuus pieneni kasvukauden edetessä, mutta valkolupiinin koostumuksessa tapahtuneet muutokset olivat huomattavasti hitaampia kuin vehnän. Valkolupiinin raakavalkuaispitoisuus oli kaikissa kasvuasteissa selvästi vehnän raakavalkuaispitoisuutta suurempia.

Vehnän NDF-pitoisuudessa ei tapahtunut suuria muutoksia kasvuston vanhetessa, sen sijaan valkolupiinin NDF-pitoisuus lisääntyi selvästi kasvukauden edetessä. Vehnän NDF-pitoisuus oli kaikissa kasvuasteissa suurempi kuin valkolupiinin.

Säilörehun raaka-aineen sokeripitoisuus, liukoinen typpi ja puskurikapasiteetti määritettiin vain kahdesta ensimmäisestä kasvuasteesta. Sekä vehnän että valkolupiinin sokeripitoisuus väheni kasvuston vanhetessa. Valkolupiinin sokeripitoisuus oli suurempi kuin vehnän, vehnässä puolestaan oli selvästi enemmän tärkkelystä. Vehnän tärkkelyspitoisuus myös lisääntyi kasvuston ikääntyessä, valkolupiinin tärkkelyspitoisuus sen sijaan vähentyi.

Vehnän sulavuudessa (D-arvo) ei tapahtunut muutoksia kolmen kasvuasteen välillä. Lupiinin sulavuus sen sijaan pieneni 1,64 g/kg ka/vrk kasvuasteiden 1,2 ja 3 välillä. Kahdessa ensimmäisessä kasvuasteessa valkolupiinin sulavuus oli parempi kuin vehnän, kolmannessa kasvuasteessa valkolupiini ja vehnä olivat yhtä sulavia.

Kasvuasteissa 1 ja 2 valkolupiinin puskurikapasiteetti oli huomattavasti korkeampi kuin vehnän. Kasvuasteessa 2 sekä vehnän että valkolupiinin puskurikapasiteetti oli korkeampi kuin kasvuasteessa 1. Molempien kasvilajien liukoisen typen osuus typen kokonaispitoisuudesta pieneni kasvuston vanhetessa ja vehnän liukoisen typen osuus oli valkolupiinia suurempi. Valkolupiinin lupaniinipitoisuus pieneni kasvuston vanhetessa. Muutos oli suurin 2. ja 3. kasvuasteen välillä.

Rehun säilöttävyyttä voidaan kuvata fermentaatiokertoimella, jossa huomioidaan rehun raaka-aineen kuiva-aine- ja sokeripitoisuuden ja puskurikapasiteetin vaikutus säilönnän helppouteen tai vaikeuteen. Kun fermentaatiokerroin on >45 , rehu on helposti säilöttävä ja rehut, joiden fermentaatiokerroin on <35 , ovat puolestaan vaikeasti säilöttäviä. (Weissbach ja Auerbach 2012). Tässä kokeessa valkolupiinin fermentaatiokertoimet olivat erittäin

pienet molemmissa kasvuasteissa. Vehnä puolestaan oli molemmissa kasvuasteissa säilöttävyydeltään keskimääräinen. Kaikki vehnästä ja valkolupiinista muodostetut seokset olivat fermentaatiokertoimen perusteella vaikeasti säilöittäviä.

Valkolupiinin energia-arvo (muuntokelpoinen energia) oli kahdessa ensimmäisessä kasvuasteessa hieman suurempi kuin vehnän. Ero pieneni toisessa kehitysasteessa ja kolmannessa kehitysasteessa valkolupiinin ja vehnän energia-arvot eivät enää eronneet toisistaan. Seoksen valkolupiinipitoisuuden nostaminen lisäsi seoksen energiasisältöä, mutta ero energiasisällöltään suurimman ja pienimmän rehuerän välillä oli vain 0,20 MJ/kg ka.

Rehuseosten luonnollisten *Lactobacillus*-maitohappobakteerien määrä oli pienempi toisessa kasvuasteessa kuin ensimmäisessä. Myös enterokokkien määrä oli toisessa kehitysasteessa ensimmäistä pienempi. Klostridien määrä oli ensimmäisessä kasvuasteessa hieman suurempi kuin toisessa, seosten välisiä suuria eroja ei havaittu. Seos ei vaikuttanut myöskään enterokokkien määrään. Sen sijaan *Lactobacillusten* määrä oli hieman suurempi lupiinivaltaisemmassa seoksessa.

Taulukko 7. Amaretto-vehnäkasvuston raaka-aineiden koostumus (g/kg ka, ellei muuta mainittu, fermentaatiokerrointa lukuun ottamatta) ja kasvustoista muodostettujen seosten mikrobisto. Seoksessa 1 valkolupiinia 1/3 ja vehnää 2/3 tuorepainosta, seoksessa 2 valkolupiinia 2/3 ja vehnää 1/3 tuorepainosta.

	Kehityssaste 1				Kehityssaste 2				Kehityssaste 3		
	Valko-lupiini	Vehnä	Seos 1	Seos 2	Valko-lupiini	Vehnä	Seos 1	Seos 2	Valko-lupiini	Vehnä	
Kuiva-aine, g/kg	166	383	307	235	145	376	285	212	163	594	
Kuiva-aineesta, %											
Valkolupiini											
Vehnä			17,7	46,2			16,1	43,4			
Tuhka	70,2	96,2	82,3	53,8			83,9	56,6			
Raakavalkuainen	184	71	91,6	84,2	68,7	88,1	85,0	79,7	67,1	81,3	
NDF ¹	390	520	497	123	182	61	81	114	165	63	
Sokeri	126	83	91	103	83	525	510	486	485	529	
Tärkkelys	30	183	152	113	23	35	43	56			
D-arvo ²	622	580	587	599	599	255	218	154	12	264	
D-arvo ³	630				608	584	586	591	581	584	
Lupaniini	0,145								591		
Puskurikapasiteetti, mEq/kg ka	709	297	370	488	687	296	359	466	0,058		
Puskurikapasiteetti, g maitohappoa/kg ka	63,9	26,7	33,3	43,9	61,9	26,6	32,8	41,9			
Fermentaatiokerroin	18,0	40,5	32,7	25,2	15,5	38,5	29,5	22,2			
WSC/BC ⁴	1,97	3,13	2,73	2,35	1,35	1,33	1,31	1,34			
Energia-arvo ME (MJ/kg ka)	9,64	8,99	9,10	9,28	9,28	9,05	9,08	9,16	9,01	9,05	
Liukoinen N, g/kg N	360	658	605	520	361	610	570	502			
<i>Lactobacillus</i> spp. ⁵			5,69	5,82			4,84	5,05			
Klostridi-itiöt ⁶			4,43	4,32			4,10	4,12			
<i>Enterococcus</i> spp. ⁶			5,61	5,58			4,58	4,54			
Mikrobit yhteensä ⁵			9,09	8,89			9,25	9,20			

¹ Neutraalidetergenttikuitu

² valkolupiinin D-arvo eli sulavuus laskettu puna-apilan kaavalla ja vehnän D-arvo kokoviljasäilörehun kaavalla

³ Valkolupiinin D-arvo eli sulavuus laskettu yleiskaavalla

⁴ Sokeripitoisuuden (g/kg ka) suhde puskurikapasiteettiin (g maitohappoa/kg ka)

⁵ log₁₀ 16S rRNA geenikopiota/g tuoretta rehua

⁶ log₁₀ 16S rRNA geeniä/g tuoretta rehua

5.4 Säilörehun koostumus ja säilönnällinen laatu

5.4.1 Kuiva-aine ja tuhka

Valmiiden säilörehujen kuiva-ainepitoisuus vaihteli välillä 218–327 g/kg (taulukot 9–12). Lupiinivaltaisemmat seokset olivat selvästi vehnävaltaisempia seoksia märempiä. Eri kasvuasteen rehujen kuiva-ainepitoisuuksissa ei ollut suurta eroa. Säilöntä ilman säilöntäainetta (PR) tuotti muita rehuja märempää säilörehua kasvuasteella 1 molemmissa seoksissa ($P<0,05$). Rehussa K2S1 biologisella säilöntäaineella käsitelty rehu oli kuivempaa kuin muilla säilöntäaineilla tehdyt rehut ($P<0,10$). Rehussa K2S2 ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja säilöntäainekäsittelyiden kuiva-ainepitoisuudessa.

Kasvuasteiden, seosten ja säilöntäainekäsittelyiden välillä esiintyi jonkin verran vaihtelua säilörehun tuhkapitoisuudessa. Kasvuasteella 1 molemmissa seoksissa painorehun tuhkapitoisuus oli muita rehuja suurempi ($P<0,01$). Muut säilöntäainekäsittelyt eivät eronneet toisistaan merkitsevästi. Kasvuasteen 2 vehnävaltaisemmassa seoksessa LAB-rehun tuhkapitoisuus oli merkitsevästi pienempi kuin MH- ja NaHe-rehujen ($P<0,05$). Muurahaishapporehun tuhkapitoisuus oli NaHe-rehua suurempi ($P<0,05$). Rehussa K2S2 painorehun tuhkapitoisuus oli suurempi kuin muiden käsittelyiden ($P<0,01$).

5.4.2 pH

Molemmissa seoksissa ja kasvuasteissa muurahaishappo laski välittömästi raaka-aineen pH:n alle 4:n (taulukko 8). Säilönnän aikana käymisen edetessä pH kuitenkin nousi tästä (Taulukot 8–11). Kaikkien valmiiden säilörehujen pH vaihteli välillä 3,75–5,01. Kasvuasteella 1 biologinen säilöntäaine laski pH:n alemmaksi kuin muut tutkitut säilöntäaineet (3,75 ja 3,83; seos 1 ja 2; $P<0,001$ ja $P<0,01$). Kasvuasteella 2 painorehun pH oli kaikkein matalin, vehnävaltaisemmassa seoksessa 4,05 ($P<0,01$) ja lupiinivaltaisemmassa seoksessa 3,95 ($P>0,05$). Kasvuasteella 1 NaHe-säilöntäaineella säilötyn rehun pH jäi muurahaishapolla säilöttyä rehua korkeammaksi (S1: $P<0,001$, S2: $P<0,01$). Toisen kasvuasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa puolestaan NaHe-säilöntäaine laski pH:ta tehokkaammin kuin muurahaishappo ($P<0,001$).

Taulukko 8. Raaka-aineen pH säilöntäaineen lisäyksen jälkeen

	Kasvuaste 1		Kasvuaste 2	
	Seos 1	Seos 2	Seos 1	Seos 2
PR	5,72	5,77	6,68	6,88
MH	3,57	3,54	3,69	3,68
NaHe	5,88	5,73	6,66	6,25
LAB	5,82	5,75	6,70	6,59

5.4.3 Sokeri

Valmiiden säilörehujen sokeripitoisuudessa esiintyi huomattavaa vaihtelua säilöntäainekäsittelyiden välillä (12,7–113 g/kg ka). Sokeripitoisuudet olivat pienimmät PR- ja LAB-käsittelyillä kaikissa raaka-ainevaihtoehdoissa. Toisen kasvuasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa kaikkien käsittelyiden sokeripitoisuus oli hyvin matala. Kasvuasteella 1 molemmissa seoksissa ja K2S1-rehussa painorehun sokeripitoisuus oli muita rehuja pienempi ($P < 0,01$). Näissä seoksissa myös LAB-rehun sokeripitoisuus oli MH- ja NaHe-rehua pienempi ($P < 0,01$). MH- ja NaHe-rehun sokeripitoisuudessa ei havaittu eroja missään seoksessa ($P > 0,05$). Toisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa säilöntäainekäsittelyiden sokeripitoisuudet eivät olleet normaalijakautuneet, eikä parivertailussa havaittu mitään eroja säilöntäainekäsittelyiden välillä.

Taulukko 9. Säilöntäaineen vaikutus rehun koostumukseen ja säilönnälliseen laatuun ensimmäisen kehitystasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa (S1) (g/kg kuiva-ainetta, ellei muuta mainittu). Seoksessa valkoluipiina 1/3 ja kevätevehnää 2/3 tuorepainosta.

	Säilöntäaineet ¹				Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo			
	PR	MH	NaHe	LAB	SEM	PR vs. muut	LAB vs. MH ja NaHe	MH vs. NaHe
Kuiva-aine (g/kg)	290	311	313	309	6,3	0,02	0,677	0,801
pH	4,53	4,28	5,01	3,75	0,028	<0,001	<0,001	<0,00
Tuhka	91,6	82,4	79,1	79,3	1,88	<0,001	0,537	0,249
Sokeri	29	109	113	24	5,7	<0,001	<0,001	0,622
Raakavalokuainen	102,4	91,8	91,0	95,4	2,09	0,004	0,158	0,794
NH ₄ -N/kok.N	188,2	66,3	107	62,3	5,20	<0,001	0,005	<0,00
NH ₄ -N/kok.N ²	188,2	66,3	25	62,3	5,00	<0,001	0,026	<0,00
Maitohappo	32,5	2,9	17,2	53,0	1,92	0,006	<0,001	<0,00
Etikkahappo	3,24	4,59	10,48	4,75	0,417	<0,001	<0,001	<0,00
Proptonihappo	0,833 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,0192		Ei normaaliajakautunut	
Isovoihappo	0,000	0,000	0,000	0,000	-		Ei normaaliajakautunut	
Voihappo	37,69 ^a	6,01 ^{ab}	0,00 ^b	0,00 ^b	1,297		Ei normaaliajakautunut	
Isovaleriaanahappo	0,230	0,000	0,000	0,000	0,0575		Ei normaaliajakautunut	
Valeriaanahappo	0,000	0,000	0,000	0,000	-		Ei normaaliajakautunut	
Kapronihappo	0,810	0,478	0,000	0,000	0,2386		Ei normaaliajakautunut	
C4-C6-hapot ³	38,73	6,49	0,00	0,00	1,478		Ei normaaliajakautunut	
VFA ⁴	42,8	11,1	10,5	4,8	1,416	<0,001	0,009	0,773
Käymishapot yhteensä ⁵	75,4	13,9	27,7	57,7	2,91	<0,001	<0,001	0,011
Maitohappo/Etikkahappo	10,09	0,69	1,64	11,23	0,637	<0,001	<0,001	0,323
Maitohappo, % hapoista ⁵	43,0 ^{ab}	15,7 ^b	62,0 ^{ab}	91,7 ^a	4,249		Ei normaaliajakautunut	
Metanoli	1,96	1,30	1,82	1,30	0,0996	0,003	0,067	0,007
Etanoli	25,23	3,78	2,32	6,37	0,554	<0,001	0,002	0,01
Propanoli	0,460 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,055		Ei normaaliajakautunut	
Butanoli	0,347 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,0017		Ei normaaliajakautunut	

Taulukossa parivertailujen keskiarvojen välinen ero on ilmaistu kirjaimilla (a,b), niin että jos säilöntäainekäsittelyiden välillä on ero (P<0,05), ne on ilmaistu eri kirjaimin. SEM: keskiarvon keskivirhe.

¹ PR: ei säilöntäainetta (painorehu), MH: muurahaisahappo, NaHe: heksamiiniin ja natriumnitriitin seos, LAB: maitohappobakteeri *Lactobacillus plantarum*

² Vähennetty säilöntäaineesta lisätty typpi. Kaikki säilöntäaineesta lisätty N on laskettu korjatussa pitoisuudessa ammoniakitypeksi, koska tarkkaa tietoa muuntumisuudesta ei ole käytettävissä.

³ Isovoihappo, voihiappo, isovaleriaanahappo, valeriaanahappo, kapronihappo

⁴ Etikkahappo, proptonihappo, isovoihappo, voihiappo, isovaleriaanahappo, valeriaanahappo, kapronihappo

⁵ VFA + maitohappo

Taulukko 10. Säilöntäaineen vaikutus rehun koostumukseen ja säilönnälliseen laatuun ensimmäisen kehitystasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa (S2) (g/kg kuiva-ainetta, ellei muuta mainittu). Seoksessa valkoluipia 2/3 ja kevätevehnää 1/3 tuorepainosta.

	Säilöntäaineet ¹				Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo			
	PR	MH	NaHe	LAB	SEM	PR vs. muut	LAB vs. MH ja NaHe	MH vs. NaHe
Kuiva-aine (g/kg)	226	237	240	245	4,1	0,016	0,238	0,556
pH	4,60	4,06	4,67	3,83	0,094	0,006	0,002	0,002
Tuhka	84,5	75,6	75,4	73,3	1,76	0,002	0,333	0,928
Sokeri	14,2	87,2	112,0	21,3	17,07	0,017	0,006	0,335
Raakavalkuainen	125	119	107	114	3,1	0,013	0,805	0,028
NH ₄ -N/kok.N	240,9	63,9	126,9	59,9	10,30	<0,001	0,023	0,003
NH ₄ -N/kok.N ²	240,9	63,9	37,4	59,9	10,30	<0,001	0,482	0,106
Maitohappo	45,9	24,9	38,4	75,3	7,54	0,975	0,002	0,244
Etikkahappo	7,23	6,79	11,71	7,27	0,718	0,141	0,055	0,002
Propionihappo	2,53 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,397		Ei normaaliajakautunut	
Isovohappo	0,303	1,833	0,000	0,000	0,6232		Ei normaaliajakautunut	
Voihappo	43,09	9,32	0,54	0,00	3,201	<0,001	0,245	0,089
Isovaleriaanahappo	0,293	0,280	0,000	0,000	0,1015		Ei normaaliajakautunut	
Valeriaanahappo	0,293	0,000	0,000	0,000	0,0736		Ei normaaliajakautunut	
Kapronihappo	1,340	0,985	0,282	0,000	0,3108	0,034	0,134	0,149
C4-C6-hapot ³	45,33	12,41	0,82	0,00	3,990	<0,001	0,213	0,075
VFA ⁴	55,1	19,2	12,5	7,27	4,69	<0,001	0,174	0,345
Käymishapot yhteensä ⁵	101,0	44,2	50,9	82,6	10,10	0,008	0,022	0,649
Maitohappo/Etikkahappo	6,61	3,51	3,28	10,36	1,124	0,514	0,001	0,889
Maitohappo, % hapoista ⁵	45,7	40,0	74,7	91,3	10,43		Ei normaaliajakautunut	
Metanoli	3,72	3,33	3,56	3,16	0,002	0,219	0,332	0,482
Etanoli	28,29	5,92	5,42	12,91	0,001	<0,001	0,004	0,815
Propanoli	0,627 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,1417		Ei normaaliajakautunut	
Butanoli	0,593 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b	0,0793		Ei normaaliajakautunut	

¹ Taulukossa parivertailujen keskiarvojen välinen ero on ilmaistu kirjaimilla (a,b), niin että jos säilöntäainekäsittelyiden väliä on ero (P<0,05), ne on ilmaistu eri kirjaimin. SEM: keskiarvon keskivirhe

² PR: ei säilöntäainetta (painorehu), MH: muurahaisahappo, NaHe: heksamiinin ja natriumnitriitin seos, LAB: maitohappobakteeri *Lactobacillus plantarum*

³ Vähennetty säilöntäaineesta lisätty typpi. Kaikki säilöntäaineesta lisätty N on laskettu korjatussa pitoisuudessa ammoniakitypeksi, koska tarkkaa tietoa muuntumisosuudesta ei ole

⁴ Isovohappo, propionihappo, valeriaanahappo, kapronihappo

⁵ VFA + maitohappo

Taulukko 11. Säilöntäaineen vaikutus rehun koostumukseen ja säilönnälliseen laatuun toisen kehitysasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa (S1) (g/kg kuiva-ainetta, ellei muuta mainittu). Seoksessa valkolupiinia 1/3 ja kevävehnää 2/3 tuorepainosta.

	Säilöntäaineet ¹						Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo		
	PR	MH	NaHe	LAB	SEM	PR vs. muut	LAB vs. MH ja NaHe	MH vs. NaHe	
Kuiva-aine (g/kg)	315	311	317	327	5,3	0,583	0,091	0,434	
pH	4,05	4,69	4,20	4,08	0,047	0,002	<0,001	<0,001	
Tuhka	67,1	73,5	68,1	66,4	1,25	0,165	0,022	0,016	
Sokeri	12,7	33,6	39,1	15,0	2,26	<0,001	<0,001	0,125	
Raakavalkuainen	85,4	86,7	82,1	83,5	1,95	0,586	0,711	0,138	
NH ₄ -N/kok.N	129	128	124	107	7,5	0,298	0,069	0,729	
NH ₄ -N/kok.N ²	129 ^a	128 ^{ab}	36 ^b	107 ^{ab}	7,3		Ei normaalijakautunut		
Maitohappo	41,9	3,8	32,7	34,7	2,37	<0,001	<0,001	<0,001	
Etikkahappo	6,37	4,85	9,36	4,26	1,103	0,873	0,069	0,021	
Propionihappo	0,000 ^b	0,776 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,0149		Ei normaalijakautunut		
Isovoihappo	0,000 ^b	0,532 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,0497		Ei normaalijakautunut		
Voihappo	4,44	11,58	0,00	5,69	1,526	0,475	0,96	<0,001	
Isovaleriaanahappo	0,000 ^b	0,643 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,0072		Ei normaalijakautunut		
Valeriaanahappo	0,000 ^b	0,322 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b	0,0036		Ei normaalijakautunut		
Kapronihappo	0,000 ^b	3,15 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,134		Ei normaalijakautunut		
C4-C6-hapot ³	4,44	16,23	0,00	5,69	1,550	0,148	0,238	<0,001	
VFA ⁴	10,8	21,9	9,4	10,0	1,71	0,178	0,028	<0,001	
Käymishapot yhteensä ⁵	52,7	25,6	42,0	44,6	3,12	0,003	0,023	0,006	
Maitohappo/Etikkahappo	7,17	0,82	3,51	8,42	0,800	0,014	<0,001	0,045	
Maitohappo, % hapoista ⁵	79,6	14,5	77,7	77,5	2,30	<0,001	<0,001	<0,001	
Metanoli	1,25	0,96	1,64	1,20	0,066	0,812	0,41	<0,001	
Etanoli	5,80	3,99	1,61	4,35	0,005	0,002	0,003	0,009	
Propanoli	0,000	0,000	0,000	0,000	-		Ei normaalijakautunut		
Butanoli	0,000	0,000	0,000	0,000	-		Ei normaalijakautunut		

Taulukossa parivertailujen keskiarvojen välinen ero on ilmaistu kirjaimilla (a,b), niin että jos säilöntäainekäsittelyiden väliä on ero (P<0,05), ne on ilmaistu eri kirjaimin. SEM: keskiarvon keskiarvo
¹ PR: ei säilöntäainetta (painorehu), MH: muurahaisahappo, NaHe: heksamiini ja natriumnitriitin seos, LAB: maitohappobakteeri *Lactobacillus plantarum*

² Vähennetty säilöntäaineesta lisätty typpi. Kaikki säilöntäaineesta lisätty N on laskettu korjatussa pitoisuudessa ammoniakitypeksi, koska tarkkaa tietoa muuntumisosuudesta ei ole käytettävissä.

³ Isovoihappo, voihappo, isovaleriaanahappo, valeriaanahappo, kapronihappo

⁴ Etikkahappo, propionihappo, isovoihappo, voihappo, isovaleriaanahappo, valeriaanahappo, kapronihappo

⁵ VFA + maitohappo

Taulukko 12. Säilöntäaineen vaikutus rehun koostumukseen ja säilönnälliseen laatuun toisen kehityssasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa (S2) (g/kg kuiva-ainetta, ellei muuta mainittu). Seoksessa valkolupiinia 2/3 ja kevätvehnää 1/3 tuorepainosta.

	Säilöntäaineet ¹				Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo			
	PR	MH	NaHe	LAB	SEM	PR vs. muut	LAB vs. MH ja NaHe	MH vs. NaHe
Kuiva-aine (g/kg)	218	226	229	245	9,5	0,201	0,175	0,858
pH	3,93	4,20	3,96	4,00	0,146	0,501	0,693	0,279
Tuhka	63,2	75,8	72,6	73,2	2,16	0,003	0,711	0,322
Sokeri	15,3	65,9	30,5	13,4	8,82		Ei normaaliajakautunut	
Raakavalkuainen	112	109	106	102	4,8	0,281	0,423	0,655
NH ₄ -N/kok.N	155	112	138	130	21,8		Ei normaaliajakautunut	
NH ₄ -N/kok.N ²	155	112	44	130	21,7		Ei normaaliajakautunut	
Maitohappo	70,4	5,1	57,8	45,8	8,41	0,008	0,201	0,003
Etikkahappo	10,3	8,3	11,7	13,4	2,40	0,770	0,287	0,348
Propionihappo	0,00	1,54	0,00	0,00	0,769		Ei normaaliajakautunut	
Isovoihappo	0,000	0,995	0,000	0,000	0,3865		Ei normaaliajakautunut	
Voihappo	5,16	8,70	0,43	6,51	3,992	0,991	0,701	0,182
Isovaleriaanahappo	0,000	0,435	0,000	0,000	0,1213		Ei normaaliajakautunut	
Valeriaanahappo	0,000	0,699	0,000	0,000	0,3496		Ei normaaliajakautunut	
Kapronihappo	0,000	2,747	0,319	0,394	1,0491		Ei normaaliajakautunut	
C4-C6-hapot ³	5,16	13,57	0,75	6,91	5,580	0,774	0,972	0,143
VFA ⁴	15,5	23,5	12,5	20,3	6,85	0,691	0,789	0,29
Käymishapot yhteensä ⁵	85,8	28,5	70,2	66,1	9,80	0,026	0,202	0,017
Maitohappo/Etikkahappo	6,94	0,52	5,13	4,41	1,094	0,022	0,271	0,018
Maitohappo, % hapoista ⁵	82,0	15,1	81,7	66,0	7,29	0,011	0,085	<0,001
Metanoli	3,38	2,65	3,27	2,82	0,274	0,177	0,689	0,151
Etanoli	11,34 ^a	3,41 ^b	3,57 ^{ab}	7,55 ^{ab}	0,869	<0,001	0,006	0,902
Propanoli	0,000	0,140	0,000	0,000	0,070		Ei normaaliajakautunut	
Butanoli	0,000	0,000	0,000	0,000	-		Ei normaaliajakautunut	

Taulukossa parivertailujen keskiarvojen välinen ero on ilmaistu kirjaimilla (a,b), niin että jos säilöntäainekäsittelyiden välillä on ero (P<0,05), ne on ilmaistu eri kirjaimin. SEM: keskiarvon keskiarvo

¹ PR: ei säilöntäainetta (painorehu), MH: muurahaishappo, NaHe: heksaminiin ja natriumtriitiin seos, LAB: maitohappobakteeri *Lactobacillus plantarum*

² Vähennetty säilöntäaineesta lisätty tyyppi. Kaikki säilöntäaineesta lisätty N on laskettu korjatussa pitoisuudessa ammoniakitypeksi, koska tarkkaa tietoa muuntumisosuudesta ei ole käytettävissä.

³ Isovoihappo, voihappo, isovaleriaanahappo, valeriaanahappo, kapronihappo

⁴ Etikkahappo, propionihappo, isovoihappo, voihappo, isovaleriaanahappo, valeriaanahappo, kapronihappo

⁵ VFA + maitohappo

Taulukko 13. Säilörehun laatuvaatimusten laatutekijöiden ylärajat säilörehun eri laatuluokissa (MMM 1999) verrattuna tutkittujen säilörehujen tuloksiin tuoreessa säilörehussa.

	Laatutekijä				
	Maitohappo (g/kg)	Etikkahappo (g/kg)	Voihappo (g/kg)	NH ₄ N/kok. ¹ (g/kg)	Happamuus ² (pH)
Säilörehun laatuluokka					
Hyvä	25,00	6,00	1,00	80,0	4,20
Tyydyttävä	ei rajoitusta	10,00	1,00	120,0	4,20
K1S1					
PR	9,43	0,94	10,93	188,2	4,53
MH	0,88	1,43	1,86	66,3	4,28
NaHe	5,36	3,27	0,00	22,8	5,01
LAB	16,35	1,47	0,00	62,3	3,75
K1S2					
PR	10,41	1,63	9,73	240,9	4,60
MH	5,94	1,61	2,21	63,9	4,06
NaHe	9,18	2,81	0,13	33,9	4,67
LAB	18,42	1,78	0,00	59,9	3,83
K2S1					
PR	13,22	2,01	1,40	129,4	4,05
MH	1,19	1,53	3,62	128,1	4,69
NaHe	10,39	2,97	0,00	32,8	4,20
LAB	11,31	1,38	1,88	106,9	4,08
K2S2					
PR	15,39	2,25	1,11	154,6	3,93
MH	1,16	1,89	2,04	112,0	4,20
NaHe	13,12	2,70	0,10	39,7	3,96
LAB	10,82	3,39	1,60	130,0	4,00

¹ Korjattu ammoniumtyppi kokonaistypestä, g/kg

² Poikkeukset pH:n osalta: Jos säilörehun kuiva-ainepitoisuus on 275–450 g/kg, pH voi sekä hyvän että tyydyttävän säilörehun luokassa ylittää arvon 4,20. Jokaisessa luokassa pH voi olla 0,2 yksikköä korkeampi, jos sokeripitoisuus on vähintään 30 g/kg kuiva-ainetta.

5.4.4 Valkuaisen hajoaminen säilönnän aikana

Valmiiden säilörehujen raakavalkuaispitoisuus vaihteli välillä 82,1–125 g/kg ka. Pitoisuudet olivat suurempia lupiinivaltaisemmissa seoksissa kuin vehnävaltaisemmissa. Ensimmäisen kasvuasteen molemmissa seoksissa painorehun raakavalkuaispitoisuus oli suurempi kuin muiden rehujen ($P<0,05$). Missään rehussa ei ollut eroja biologisella säilöntäaineella säilöttyjen rehujen ja kemiallisilla säilöntäaineella säilöttyjen rehujen välillä ($P>0,05$). Ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa muurahaishapporehun raakavalkuaispitoisuus oli suurempi kuin NaHe-rehun ($P<0,05$).

Säilörehujen korjaamattoman ammoniumtypen osuus vaihteli välillä 60–241 g/kg ka. Korkeimmat ammoniumtypen osuudet mitattiin kaikissa rehuerissä painorehusta. Kasvuasteen 1 molemmissa seoksissa painorehu erosi muista rehuista merkitsevästi ($P < 0,001$). Toisen kasvuasteen vehnävaltaisemman seoksen painorehu ei sen sijaan eronnut muista käsittelyistä ($P > 0,05$). Toisen kasvuasteen lupiinivaltaisemman seoksen ammoniumtypen osuuden mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet, eikä parivertailussa havaittu merkitseviä eroja. Molempien kasvuasteiden vehnävaltaisemmissa seoksissa ja ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa biologisella säilöntäaineella säilötyn rehun ammoniumtypen osuudet olivat pienemmät kuin kemiallisilla säilöntäaineilla (MH ja NaHe) säilöttyjen rehujen (K1S1: $P < 0,001$, K1S2: $P < 0,05$ ja K2S1: $P < 0,10$). Ensimmäisen kasvuasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa muurahaishappokäsittelyn rehun ammoniumtypen osuus oli pienempi kuin NaHe-rehun ($P < 0,001$). Saman kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa tilanne oli päinvastoin ($P < 0,01$).

Ammoniumtypen korjauksen jälkeen kaikkien NaHe-rehujen ammoniumtypen osuudet pienenivät 68–77 %. Korjauksen jälkeen pienimmät ammoniumtypen osuudet mitattiin kaikissa seoksissa ja kasvuasteissa NaHe-rehuista. Kasvuasteen 1 molemmissa seoksissa painorehu erosi edelleen muista rehuista ($P < 0,001$). Rehussa K1S1 biologisella säilöntäaineella säilötyn rehun ammoniumtypen pitoisuudet erosivat typen korjauksen jälkeenkin kemiallisilla säilöntäaineilla (MH ja NaHe) säilötyistä rehuista ($P < 0,05$). Korjauksen jälkeen NaHe-rehun ammoniumtypen osuudet olivat pienemmät ja MH-rehun pitoisuudet suuremmat kuin LAB-rehun. Rehussa K1S1 NaHe-rehun korjatun ammoniumtypen osuudet olivat pienempiä kuin MH-rehun ($P < 0,001$). Rehussa K1S2 ei havaittu typen korjauksen jälkeen tilastollisia eroja eri säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen välillä ($P > 0,05$). Korjauksen jälkeen rehujen K2S1 ja K2S2 mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet. Parivertailussa rehussa K2S1 NaHe-rehun ammoniumtypen osuus oli pienempi kuin painorehun ($P < 0,05$).

5.4.5 VFA ja alkoholit

Käymishappojen kokonaismäärä

Käymishappojen kokonaismäärään laskettiin mukaan VFA (etikkahappo, propionihappo, voihiappo, isovoihappo, valeriaanahappo, isovaleriaanahappo ja kapronihappo) ja maitohappo. Valmiiden säilörehujen käymishappojen kokonaismäärä vaihteli välillä 13,9–

101 g/kg ka. Kaikissa rehuissa muurahaishapporehujen käymishappojen yhteismäärä oli pienin. Kaikissa rehuissa painorehujen käymishappojen määrä oli suurempi kuin muiden rehujen ($P < 0,05$) ja K2S2-rehuja lukuun ottamatta LAB-rehujen käymishappojen määrä oli suurempi kuin kemiallisilla säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen (MH- ja NaHe-rehut) ($P < 0,05$). Kasvuasteen 1 vehnävaltaisemmassa seoksessa ja kasvuasteen 2 molemmissa seoksissa NaHe-rehun käymishappojen määrä oli suurempi kuin MH-rehun ($P < 0,05$). Lupiinivaltaisempien seosten käymishappojen määrä oli numeerisesti suurempi kuin vehnävaltaisempien seosten.

VFA:n kokonaismäärä

Valmiiden säilörehujen VFA-pitoisuus vaihteli välillä 4,75–55,1 g/kg ka. Korkeimmat pitoisuudet mitattiin kasvuasteen 1 painorehuista ja kasvuasteen 2 muurahaishapolla säilötyistä rehuista. Pienimmät pitoisuudet mitattiin puolestaan kasvuasteen 1 LAB-rehuista ja kasvuasteen 2 NaHe-rehuista. Ensimmäisen kasvuasteen painorehujen VFA-pitoisuus oli erittäin merkitsevästi pienempi kuin muiden rehujen ($P < 0,001$). Sen sijaan rehuissa K2S1 ja K2S2 mitään eroja ei havaittu. Rehuissa K1S1 ja K2S1 LAB-rehu erosi MH- ja NaHe-rehuista ($P < 0,05$). Rehussa K1S1 LAB-rehun VFA-pitoisuus oli pienempi kuin MH- ja NaHe-rehujen, rehussa K2S1 LAB-rehun VFA-pitoisuus oli selvästi pienempi kuin MH-rehun, mutta vain hieman suurempi kuin NaHe-rehun. Lupiinivaltaisempien seosten VFA-pitoisuus oli numeerisesti vehnävaltaisempia seoksia hieman suurempi.

C4–C6-happojen kokonaismäärä

Säilörehujen C4–C6-happojen (voi-, isovoi-, valeriaana-, isovaleriaana- ja kapronihappo) pitoisuus vaihteli välillä 0,000–45,3 g/kg ka. Säilöntäainekäsittelyiden välillä ei havaittu johdonmukaisia eroja rehujen C4–C6-happojen pitoisuuksissa. Vain rehussa K1S2 havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero painorehun ja muiden rehujen välillä, jolloin painorehun C4–C6-happojen pitoisuus oli suurempi kuin muiden rehujen ($P < 0,001$). Biologisella säilöntäaineella säilötty rehu ei eronnut kemiallisilla säilöntäaineilla säilötyistä missään rehuissa ($P > 0,10$). MH- ja NaHe-rehujen välillä havaittiin ero C4–C6-happojen pitoisuudessa vain rehussa K2S1, jossa NaHe-rehun C4–C6-happojen pitoisuus oli pienempi kuin MH-rehun ($P < 0,001$). Ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa muurahaishapporehun C4–C6-happojen pitoisuus oli numeerisesti pienempi (6,49 g/kg ka) kuin muissa rehuerissä, joissa pitoisuus pysyi melko tasaisena rehuerien välillä (12,4–16,2 g/kg ka).

Etikkahappo

Säilörehujen etikkahappopitoisuus vaihteli välillä 4,26–13,4 g/kg ka. Pienimmät etikkahappopitoisuudet mitattiin rehussa K1S1 PR-rehusta, rehuissa K1S2 ja K2S2 MH-rehuista ja rehussa K2S1 LAB-rehusta. Suurimmat pitoisuudet puolestaan mitattiin rehuissa K1S1, K1S2 ja K2S1 NaHe-rehuista ja rehussa K2S2 LAB-rehusta. Rehussa K1S1 säilöntä ilman säilöntäainetta (PR) tuotti kaikkein pienimmät etikkahappopitoisuudet ($P < 0,001$). Muissa rehuissa ei havaittu painorehun eroavan muista käsittelyistä merkitsevästi ($P > 0,05$). Rehuissa K1S1 ja K1S2 LAB-rehun etikkahappopitoisuus oli suurempi kuin MH-rehun ja pienempi kuin NaHe-rehun. Erot olivat hyvin merkitseviä (K1S1: $P < 0,001$) ja suuntaa antavia (K1S2: $P < 0,10$). Rehussa K2S1 LAB-rehun etikkahappopitoisuus oli suuntaa antavasti pienempi kuin kemiallisilla säilöntäaineilla (MH ja NaHe) käsiteltyjen rehujen ($P < 0,10$). Kaikissa rehuissa NaHe tuotti pienempiä etikkahappopitoisuuksia kuin MH, erot olivat merkitseviä ($P < 0,05$) kaikissa muissa rehuissa paitsi kasvuasteen 2 lupiinivaltaisemmassa seoksessa.

Maitohappo

Säilörehujen maitohappopitoisuus vaihteli välillä 3,79–75,3 g/kg ka. Pienimmät maitohappopitoisuudet mitattiin jokaisessa rehuerässä muurahaishapolla säilötyistä rehuista. Suurimmat maitohappopitoisuudet mitattiin kasvuasteella 1 LAB-rehuista ja kasvuasteella 2 PR-rehuista. Rehuissa K1S1, K2S1 ja K2S2 painorehu erosi tilastollisesti merkitsevästi muista rehuista ($P < 0,01$). Kahdessa jälkimmäisestä säilöntä ilman säilöntäainetta tuotti kaikkein korkeimmat maitohappopitoisuudet. Rehussa K1S1 painorehun maitohappopitoisuus oli suurempi kuin MH- ja NaHe-rehujen, mutta pienempi kuin LAB-rehun. Kaikissa muissa rehuerissä, paitsi toisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa LAB-rehun maitohappopitoisuus oli merkitsevästi suurempi kuin kemiallisilla säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen (MH ja NaHe) ($P < 0,01$). Kaikissa muurahaishapporehuissa, lukuun ottamatta kasvuasteen 1 lupiinivaltaisempaa seosta, maitohappopitoisuus oli hyvin merkitsevästi pienempi kuin NaHe-rehun ($P < 0,01$).

Maitohapon ja etikkahapon suhde

Kaikki rehut sisälsivät pääsääntöisesti numeerisesti enemmän maitohappoa kuin etikkahappoa. Poikkeuksena tästä olivat kaikki MH-rehut toisen kasvuasteen vehnävaltaisempaa seosta lukuun ottamatta. Tyypillisesti PR- ja LAB-rehujen maitohapon

ja etikkahapon suhteet olivat NaHe- ja MH-rehuja selvästi korkeammat, paitsi rehussa K2S2, jossa maitohapon ja etikkahapon suhteet olivat kaikissa rehuissa melko pieniä muihin rehueriin verrattuna. Ensimmäisen kasvuasteen molemmissa seoksissa ja toisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa maitohapon ja etikkahapon suhde oli painorehussa muita rehuja suurempi ($P < 0,05$). Kaikissa muissa rehuissa paitsi rehussa K2S2 LAB-rehun maitohapon ja etikkahapon suhde oli suurempi kuin MH- ja NaHe-rehujen (S1-rehut: $P < 0,001$, K1S2: $P < 0,01$). MH- ja NaHe-rehujen välillä havaittiin ero vain toisessa kasvuasteessa, jossa NaHe-rehujen maitohapon ja etikkahapon suhde oli suurempi ($P < 0,05$).

Maitohapon osuus kaikista käymishapoista

Maitohapon osuus kaikista käymishapoista vaihteli välillä 14,5–91,3 % ja se vaihteli hyvin paljon eri säilöntäainekäsittelyiden välillä. Sen sijaan saman säilöntäainekäsittelyn maitohapon osuuden vaihtelu oli kasvuasteittain ja seoksittain yleensä paljon vähäisempää. Suurimmat maitohapon osuudet mitattiin kasvuasteessa 1 LAB-rehuista ja kasvuasteessa 2 PR-rehuista. Tosin kasvuasteella 2 erot PR-, NaHe- ja LAB-rehujen välillä olivat melko vähäisiä. Kaikissa rehuissa MH-rehujen maitohapon osuudet olivat kaikkein pienimpiä. Rehuissa K2S1 ja K2S2 painorehun maitohapon osuudet olivat suuremmat kuin muissa rehuissa ($P < 0,05$). Rehussa K2S1 LAB-rehun maitohapon osuus erosi MH- ja NaHe-rehuista ($P < 0,001$), jolloin LAB-rehun maitohapon osuus oli suurempi kuin MH-rehun, mutta samaa tasoa kuin NaHe-rehun. Rehussa K2S2 ero oli suuntaantava ($P < 0,10$) ja siinä LAB-rehun maitohapon osuus sijoittui MH- ja NaHe-rehujen väliin. Molemmissa kasvuasteen 2 seoksissa MH-rehun maitohapon osuus oli pienempi kuin NaHe-rehun ($P < 0,001$). Ensimmäisessä kasvuasteessa mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet. Parivertailussa rehussa K1S1 LAB-rehun maitohapon osuus oli suurempi kuin MH-rehun ($P < 0,05$). Rehussa K1S2 ei havaittu mitään eroavaisuuksia eri käsittelyiden välillä.

Propionihappo

Propionihapon mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet missään rehuerässä. Propionihappoa esiintyi vain yksittäisissä rehuissa, kasvuasteella 1 painorehussa ja kasvuasteella 2 muurahaishapolla säilötyssä rehussa. Parivertailussa havaittiin rehujen kasvuasteen 1 molempien seosten painorehujen ja rehun K2S1 MH-rehun propionihappopitoisuuden olevan korkeampi kuin muiden rehujen ($P < 0,05$).

Isovoihappo

Isovoihapon mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet missään rehuerässä. Isovoihappoa esiintyi rehussa K1S2 PR- ja MH-käsittelyillä ja rehuissa K2S1 ja K2S2 muurahaishapolla käsitellyissä rehuissa. Parivertailussa ei havaittu kummankaan kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa käsittelyiden välillä merkitseviä eroja ($P > 0,05$). Rehussa K2S1 muurahaishapporehun isovoihappopitoisuus oli suurempi kuin muiden rehujen ($P < 0,05$).

Voihappo

Voihapon mittaustulokset olivat normaalijakautuneet kaikissa muissa rehuissa paitsi rehussa K1S1. Säilörehujen voihaappopitoisuudet vaihtelivat välillä 0,000–11,6 g/kg ka. Ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa painorehun voihaappopitoisuus oli suurempi kuin muiden käsittelyiden ($P < 0,001$). Toisessa kasvuasteessa ei havaittu painorehun eroavan muista käsittelyistä ($P > 0,05$). Numeerisesti NaHe-käsittelyiden voihaappopitoisuus oli kaikissa rehuerissä pienempi kuin MH-käsittelyiden. Rehussa K1S2 ero oli suuntaa antava ($P < 0,10$) ja rehussa K2S1 erittäin merkitsevä ($P < 0,001$). Rehuissa K1S1 ja K2S2 ei havaittu lainkaan tilastollista merkitsevyyttä. Rehussa K1S1 havaittiin parivertailussa painorehun voihaappopitoisuuden olevan merkitsevästi korkeampi kuin NaHe- ja LAB-rehujen ($P < 0,05$).

Isovaleriaanahappo

Isovaleriaanahapon mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet missään rehuerässä. Isovaleriaanahappoa esiintyi rehuissa K1S1 painorehussa, rehussa K1S2 PR- ja MH-rehuissa ja rehuissa K2S1 ja K2S2 MH-rehussa. Parivertailussa havaittiin merkitseviä eroja vain rehussa K2S1, jossa MH-rehu erosi merkitsevästi muista käsittelyistä ($P < 0,05$).

Valeriaanahappo

Valeriaanahapon mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet missään rehuerässä. Valeriaanahappoa esiintyi rehuissa K1S2 PR-rehussa ja toisen kasvuasteen MH-rehuissa. Parivertailussa vain rehussa K2S1 havaittiin merkitseviä eroja, missä MH-rehu erosi merkitsevästi muista rehuista ($P < 0,05$).

Kapronihappo

Kapronihappoa esiintyi rehussa K1S1 PR- ja MH-rehussa K1S2 PR-, MH- ja NaHe-rehuissa, rehussa K2S1 MH-rehussa ja rehussa K2S2 MH-, NaHe- ja LAB-rehuissa. Vain ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisemman seoksen mittaustulokset olivat normaalijakautuneet kapronihapon osalta. Rehussa K1S2 painorehun kapronihappopitoisuus oli merkitsevästi suurempi kuin muiden rehujen ($P<0,05$). Biologinen säilöntäaine ei eronnut tilastollisesti muista käsittelyistä, eikä myöskään MH- ja NaHe-rehujen välillä havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. Parivertailussa havaittiin merkitseviä eroja vain rehussa K2S1, jossa MH-rehun kapronihappopitoisuus oli merkitsevästi suurempi kuin muiden rehujen ($P<0,05$).

Asetoni, 1,2-propaanidioli ja 2,3-butaanidioli

Näitä yhdisteitä ei esiintynyt missään rehuerässä.

Alkoholit

Säilörehujen etanolipitoisuus vaihteli välillä 1,61–28,3 g/kg ka. Pienimmät etanolipitoisuudet mitattiin rehuissa K1S1, K1S2 ja K2S1 NaHe-rehuista ja rehussa K2S2 MH-rehuista. Isoimmat etanolipitoisuudet mitattiin kaikissa rehuissa painorehuista. Kaikissa rehuissa painorehun etanolipitoisuus oli hyvin merkitsevästi isompi kuin muiden käsittelyiden ($P<0,01$). Kaikissa rehuissa myös biologisella säilöntäaineella käsitellyn rehun (LAB) etanolipitoisuus oli hyvin merkitsevästi suurempi kuin kemiallisella säilöntäaineella säilöttyjen rehujen (MH ja NaHe). Rehua K2S2 lukuun ottamatta NaHe-käsittely tuotti MH-käsittelyä numeerisesti pienemmät etanolipitoisuudet, mutta vain rehussa K2S1 ero oli merkitsevä ($P<0,01$).

Propanolin ja butanolin mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneet missään rehuerässä. Propanolia esiintyi rehuissa K1S1 ja K1S2 painorehussa ja rehussa K2S2 MH-rehussa. Parivertailussa havaittiin ensimmäisen kasvuasteen molempien seosten painorehujen propanolipitoisuuden olevan korkeampi kuin muiden käsittelyiden, joissa propanolia ei esiintynyt lainkaan ($P<0,05$). Butanolia esiintyi kasvuasteen 1 molemmissa seoksissa painorehussa. Parivertailussa havaittiin painorehun butanolipitoisuuden olevan korkeampi kuin muiden käsittelyiden, joissa butanolia ei esiintynyt lainkaan ($P<0,05$).

Säilörehujen metanolipitoisuus vaihteli välillä 0,956–3,72 g/kg ka. Pienimmät metanolipitoisuudet mitattiin kaikissa rehuissa LAB- ja MH-rehuista. Rehussa K1S1 painorehun metanolipitoisuus oli hyvin merkitsevästi suurempi kuin muilla käsittelyillä ($P<0,01$). Muissa rehuerissä ei havaittu painorehun eroavan muista käsittelyistä tilastollisesti. Rehussa K1S1 LAB-rehun metanolipitoisuus oli suuntaa antavasti pienempi kuin kemiallisella säilöntäaineella (PR ja NaHe) käsitellyissä rehuissa ($P<0,10$). Rehussa K1S1 ja K2S1 MH-rehujen metanolipitoisuus oli hyvin merkitsevästi pienempi kuin NaHe-rehujen ($P<0,01$).

5.5 Tuorepaino- ja kuiva-ainetappiot

Säilörehujen tuorepainotappioissa havaittiin ero ainoastaan toisen kasvuasteen vehnävaltaisemmasta seoksessa, jossa natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella säilötyn rehun tuoretappiot olivat pienemmät kuin muurahaishapporehun ($P<0,01$) (taulukko 14). Muissa käsittelyissä ja rehuerissä tilastollisia eroja ei havaittu rinnakkaisten siilojen suurten erojen vuoksi. Kasvuasteiden ja seosten välillä ei ollut havaittavissa selkeää linjaa tuorepainotappioiden määrässä (taulukko 14, kuvio 1). Suurimmat tuorepainotappiot mitattiin LAB-rehujen lupiinivaltaisemmista seoksista. Pienimmät tappiot mitattiin puolestaan NaHe-rehuista, ensimmäisen kasvuasteen vehnävaltaisempaa seosta lukuun ottamatta.

Taulukko 14. Säilörehujen tuorepainotappiot (%) noin 100 vrk säilöntäajan jälkeen

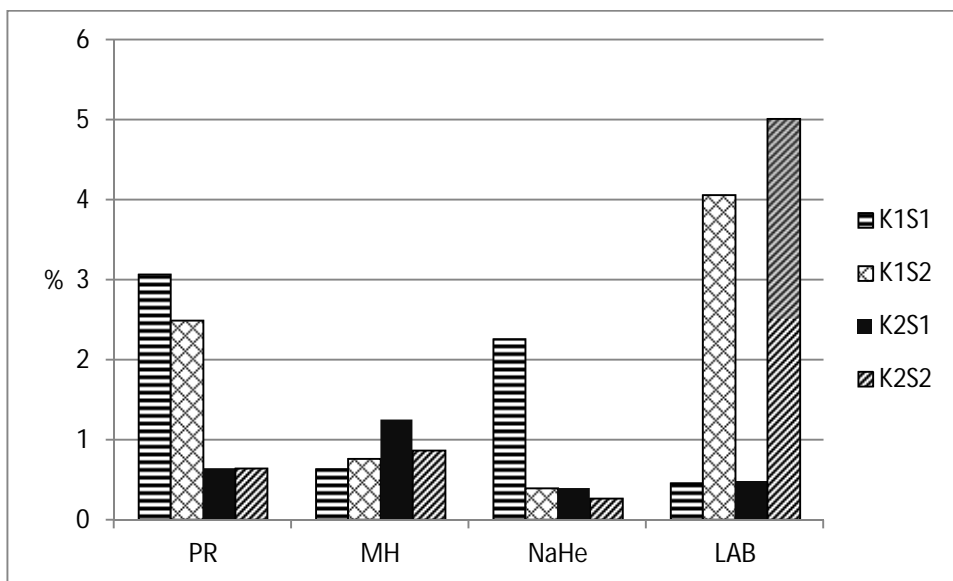
	PR	MH	NaHe	LAB	SEM	Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo		
						PR vs. muut	LAB vs. MH ja NaHe	MH vs. NaHe
K1S1	3,07	0,64	2,26	0,46	0,972	0,121	0,431	0,272
K1S2	2,50	0,77	0,40	4,07	1,740	0,717	0,141	0,885
K2S1	0,65	1,26	0,39	0,49	0,154	0,726	0,112	0,005
K2S2	0,65	0,87	0,27	5,01	2,256	0,606	0,147	0,856

K: kasvuaste, S: seos, PR: säilöntä ilman säilöntäainetta, MH: muurahaishappo, NaHe: natriumnitriitin ja heksamiinin seos, LAB: biologinen säilöntäaine, SEM: keskiarvon keskivirhe

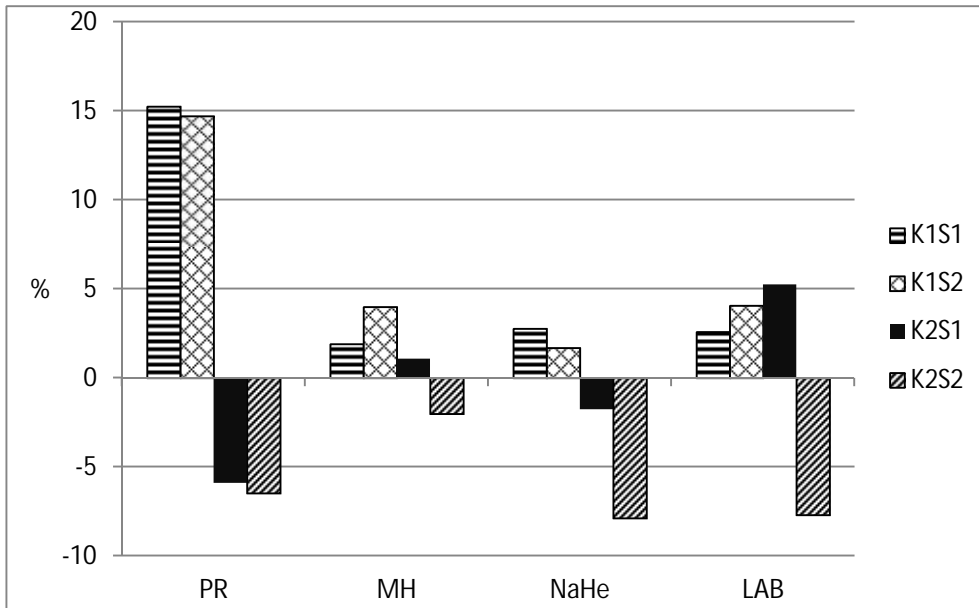
Säilörehuista laskettiin myös kuiva-ainetappiot (kuvio 2), mutta negatiivisten tulosten vuoksi niille ei ollut mielekästä tehdä tilastollista testausta. Lukumääräisesti negatiivisia kuiva-ainetappioita saatiin enemmän toisessa kasvuasteessa, jossa muutamaa yksittäistä siiloa lukuun ottamatta lähes kaikki tulokset olivat negatiivisia. Ensimmäisessä kasvuasteessa negatiivisia tuloksia havaittiin vain muutamissa siiloissa kutakin rehuerää kohden. Negatiivisista tuloksista huolimatta kuiva-ainetappiot kuitenkin havainnollistavat

säilöntäainekäsittelyiden välisiä eroja kussakin rehuerässä. Rehuerien välisten tasoerojen vuoksi kuiva-ainetappioita ei ole järkevää verrata rehuerien välillä.

Ensimmäisessä kasvuasteessa kuiva-ainetappiot olivat suurimmat painorehussa, eikä seosten välillä havaittu suurta eroa. Ensimmäisen kasvuasteen MH- ja LAB-rehuissa tappiot olivat suurimmat lupiinivaltaisessa seoksessa, NaHe-rehussa puolestaan vehnävaltaisemmassa seoksessa. Toisessakin kasvuasteessa painorehun seosten välinen ero oli pieni. Sen sijaan säilöntäainekäsittelyissä (MH, NaHe, LAB) lupiinivaltaisempien seosten kuiva-ainetappiot olivat vehnävaltaisempaa seosta pienemmät.



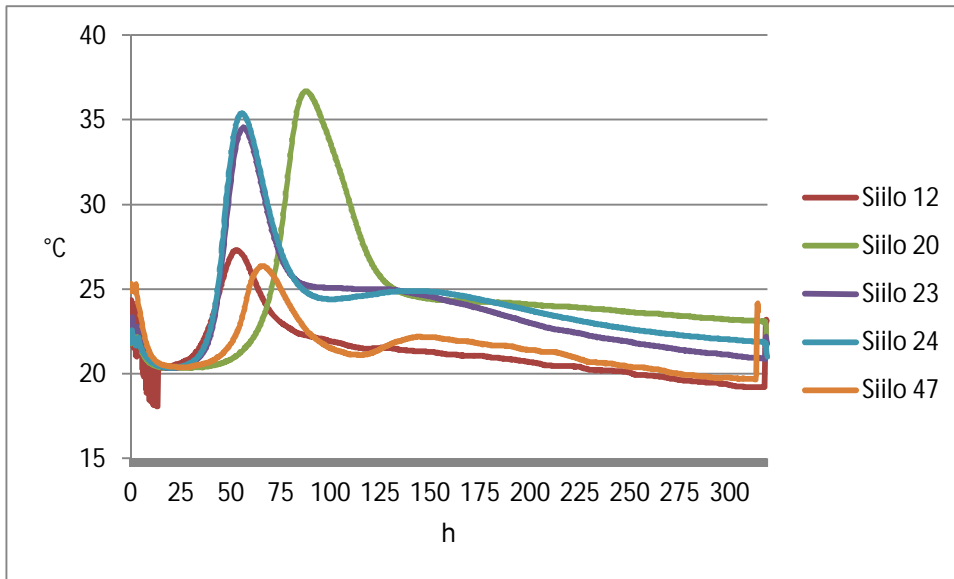
Kuvio 1. Säilörehujen tuorepainotappiot (%) noin 100 vrk säilöntäajan jälkeen. K: kasvuaste, S: seos, PR: säilöntä ilman säilöntäainetta, MH: muurahaishappo, NaHe: natriumnitriitin ja heksamiinin seos, LAB: biologinen säilöntäaine.



Kuvio 2. Säilörehujen kuiva-ainetappiot (%) noin 100 vrk säilöntäajan jälkeen. K: kasvuaste, S: seos, PR: säilöntä ilman säilöntäainetta, MH: muurahaishappo, NaHe: natriumnitriitin ja heksamiinin seos, LAB: biologinen säilöntäaine.

5.6 Aerobinen stabiilisuus

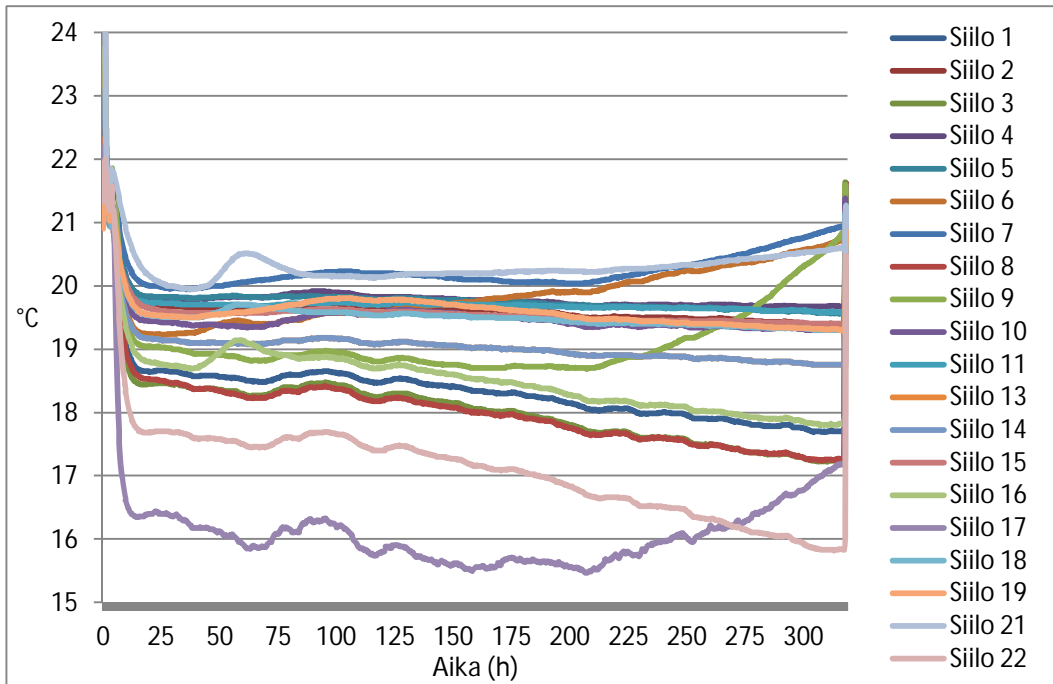
Suurin osa tämän kokeen rehuista oli aerobisesti stabiileja 13 vuorokauden mittausjakson aikana. Yksittäisissä rehuissa kuitenkin tapahtui jälkilämpenemistä. Lämmenneitä siloja oli 5 kpl kaiken kaikkiaan 48 siilosta, joten kokonaisuudessaan lämmenneiden silojen osuus oli vähäinen. Lämpenemistä tapahtui yhdessä K1S1-LAB-rehussa, yhdessä K1S2-NaHe-rehussa, kahdessa K1S2-LAB-rehussa ja yhdessä K2S2-LAB-rehussa. Säilörehujen lämpötila oli noussut 2 °C ympäristön lämpötilaan verrattuna LAB-rehuissa 38–63 h ja NaHe-rehussa 53 h kuluessa aerobisille olosuhteille altistumisesta (kuvio 3).



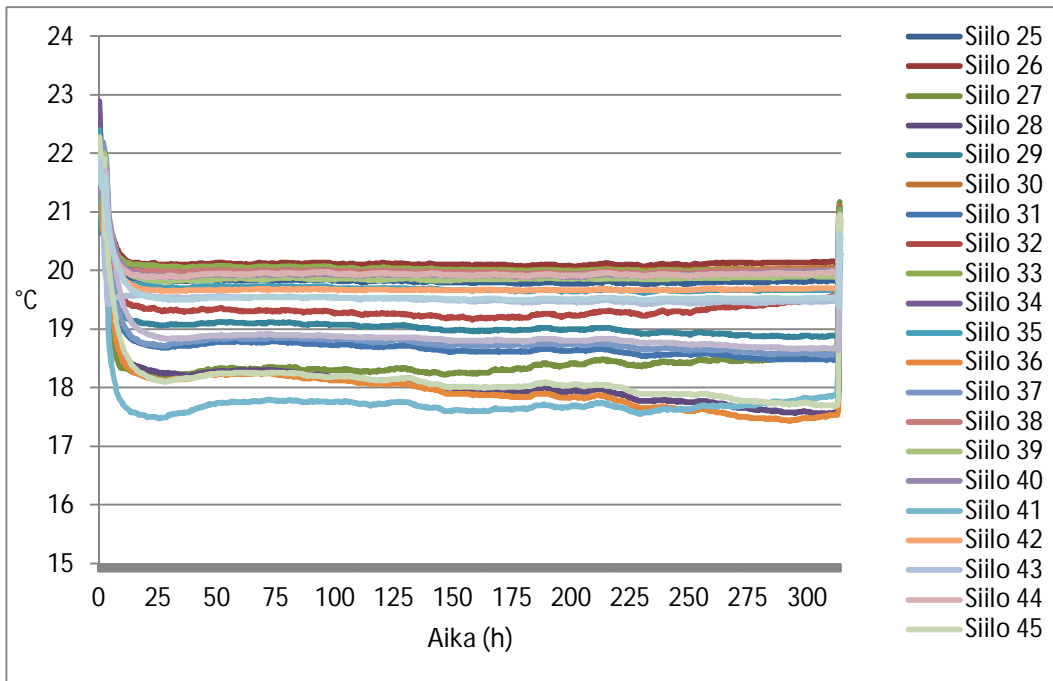
Kuvio 3. Lämmenteiden siilojen lämpötilan muutos aerobisissa olosuhteissa ajan funktiona. Siilojen lämpötilat skaalattu vastaamaan kasvatuskaapin lämpötilaa. Siilo 12: K1S1-LAB, siilo 20: K1S2-NaHe, siilo 23: K1S2-LAB, siilo 24: K1S2-LAB, siilo 47: K2S2-LAB. K: kasvuaste, S: seos, LAB: biologinen säilöntäaine, NaHe: natriumnitriitin ja heksamiinin seos.

Siilojen lämpötila tasaantui aerobisen stabiilisuden mittausjakson alussa kasvatuskaapin lämpötilaan (+ 20 °C). Tämän vuoksi kuvioissa 3, 4 ja 5 havaitaan mittausjakson alussa laskevat lämpötiläkäyrät. Lämpenemättömien siilojen lämpötila pysyi hyvin vakaana kasvuasteessa 2 (kuvio 5). Sen sijaan ensimmäisessä kasvuasteessa siilojen lämpötiloissa tapahtui enemmän vaihtelua (kuvio 4). Data loggereiden mittaamissa lämpötiloissa havaittiin tasoero eri data loggereiden välillä. Tämän vuoksi lämmenteiden siilojen lämpötilat skaalattiin vastaamaan kasvatuskaapin lämpötilaa siilojen lämpötilojen tasaannuttua. Näin ollen kuvion 3 lämpötiläkäyrät vastaavat siilojen välistä todellista lämpötilaeroa. Lämpenemättömien siilojen kohdalla skaalausta ei tehty, jonka vuoksi kuvioissa 4 ja 5 voidaan havaita siilojen välisiä tasoeroja lämpötiloissa.

Lämmenteiden siilojen pienen määrän vuoksi säilörehujen aerobista stabiilisutta ei voitu testata tilastollisesti. Numeerisesti arvioiden lämmenteiden ja lämpenemättömien rinnakkaisten siilojen välillä ei kuitenkaan havaittu selkeää syytä lämmenteiden siilojen heikompaan aerobiseen stabiilisuuteen (taulukko 15).



Kuvio 4. Kasvuasteen 1 lämpenemättömien siilojen lämpötilan muutos aerobisissa olosuhteissa ajan funktiona. Siilot 1–3: S1 PR, siilot 4–6: S1 MH, siilot 7–9: S1 NaHe, siilot 10–11: S1 LAB, siilot 13–15: S2 PR, siilot 16–18: S2 MH, siilot 19 & 21: S2 NaHe, silo 22: S2 LAB. S: seos, PR: säilöntä ilman säilöntäainetta, MH: muurahaishappo, NaHe: natriumnitriitin ja heksamiinin seos, LAB: biologinen säilöntäaine.



Kuvio 5. Kasvuasteen 2 lämpenemättömien siilojen lämpötilan muutos aerobisissa olosuhteissa ajan funktiona. Siilot 25–27: S1 PR, siilot 28–30: S1 MH, siilot 31–33: S1 NaHe, siilot 34–36: S1 LAB, siilot 37–39: S2 PR, siilot 40–42: S2 MH, siilot 43–45: S2 NaHe, siilot 46 & 48: S2 LAB. S: seos, PR: säilöntä ilman säilöntäainetta, MH: muurahaishappo, NaHe: natriumnitriitin ja heksamiinin seos, LAB: biologinen säilöntäaine.

Taulukko 15. Lämmenteiden ja lämpenemättömien rinnakkaisten sillojen säilöntälaatu.

	K1S1-LAB			K1S2-NaHe			K1S2-LAB			K2S2-LAB		
	Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 1	Silo 2	Silo 3
Kuiva-aine	306	305	315	240	234	248	241	254	240	239	274	222
pH	3,77	3,77	3,71	4,69	4,39	4,92	3,84	3,80	3,85	4,00	4,11	3,90
Tuhka	79,4	83,0	75,4	74,6	77,8	73,7	73,8	70,6	75,4	72,0	68,8	78,8
Sokeri	25,3	24,1	22,4	116	83,6	137	19,9	21,4	22,5	12,3	10,4	17,7
Raakavalkuainen	96,6	96,2	93,3	109	111	100	116	110	115	104	89,3	113
NH ₄ -N/kok.N ¹	61,3	61,8	63,7	128	124	128	62,8	47,0	70,0	133	130	127
Maitohappo	58,2	49,0	51,7	36,7	49,2	29,2	73,3	69,2	83,4	40,1	24,1	73,1
Etikkahappo	4,57	5,24	4,44	13,2	11,6	10,3	7,58	6,59	7,63	7,71	21,9	10,6
Propionihappo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Voihappo	0,000	0,000	0,000	0,550	0,867	0,205	0,000	0,000	0,000	13,3	4,52	1,76
Isovoihappo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Valeriaanahappo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isovaleriaanahappo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Kapronihappo	0,000	0,000	0,000	0,417	0,428	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,731	0,450
VFA ²	4,57	5,24	4,44	14,2	12,9	10,5	7,58	6,59	7,63	21,0	27,1	12,8
C4–C6 hapot ³	0,000	0,000	0,000	0,966	1,29	0,205	0,000	0,000	0,000	13,3	5,25	2,21
Käymishapot yhteensä ⁴	62,8	54,2	56,1	50,8	62,1	39,8	80,9	75,8	91,0	61,1	51,3	85,9
Maitohappo/etikkahappo	12,7	9,34	11,6	2,77	4,26	2,82	9,67	10,5	10,9	5,20	1,10	6,92
Maitohappo, % hapoista ⁴	92,7	90,3	92,1	72,1	79,3	73,5	90,6	91,3	91,6	65,7	47,1	85,1
Metanoli	1,27	1,56	1,08	3,63	3,76	3,28	3,49	2,92	3,06	3,10	2,48	2,87
Etanoli	6,43	7,65	5,05	4,58	7,98	3,70	15,1	12,2	11,5	7,96	6,69	8,02
Propanoli	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Butanoli	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

K1: Kasvuaste 1, K2: kasvuaste 2, S1: seos 1, S2: seos 2, LAB: biologinen säilöntäaine, NaHe: natriumnitritin ja heksamiinin seos

Lämmenteet silot (> 2 °C) **Ilhavoitu**¹ Typen korjausta ei tehty NaHe-rehujen osalta² Etikkahappo, propionihappo + C4–C6 hapot³ Voihappo, isovoihappo, valeriaanahappo, isovaleriaanahappo, kapronihappo⁴ VFA + maitohappo

6 TULOSTEN TARKASTELU

6.1 Satotaso ja fraktioinnit

Seoskasvustojen satotasot olivat samaa luokkaa kuin Viikissä aiemmin tehdyissä valkolupiini-vehnäseoskasvustojen ruutukokeissa (Stoddard ym. 2012) ja samalla tasolla tai hieman suuremmat kuin Azon ym. (2006, 2012) Iso-Britanniassa tekemissä ruutukokeissa. Azo ym. (2006) havaitsivat myös seoksessa käytetyn vehnälajikkeen vaikuttavan satomäärään. Koeruutututkimusten satomäärät ovat yleensä suurempia, kuin koko peltolohkon mittakaavassa tehtyjen tutkimusten.

Amaretto- ja Quarna-vehnälajikkeiden kuiva-ainesatotasot erosivat ainoastaan toisessa kasvuasteessa, jossa ero oli yli 2000 kg/ha Amaretto-kasvuston hyväksi. Ero voi johtua myös kasvuston epätasaisuudesta, sillä Quarna-kasvuston satotaso mitattiin ainoastaan 2m²:n alalta otettujen kasvuastenäytteiden perusteella. Amaretto-kasvuston satotaso mitattiin kehitysasteissa 1 ja 2 koko niitetyn alan perusteella.

Azo ym. (2012) raportoivat valkolupiini-vehnäseoskasvuston satotason olevan korkeimmillaan (14 610 kg ka/ha) 130 päivän kuluttua kylvöstä ja lupiinin kylvötiheyden ollessa 25 ja vehnän 250 kpl/m². Tämä kasvu aika oli pidempi ja kylvötiheys pienempi kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa. Azon ym. (2012) kokeessa valkolupiini-ruisvehnäseoskasvuston satotaso oli vielä valkolupiini-vehnäseoskasvustoakin suurempi (16 460 kg ka/ha kokoviljasäilörehuna). Sinilupiini-viljakasvustoista korjattujen kokoviljasäilörehujen satotasot ovat olleet huomattavasti pienempiä (4970–7070 kg ka/ha, Boström 2008) tai hieman suurempia (12 000 kg ka/ha, Strydhorst ym. 2008) kuin tässä kokeessa mitatut satotasot. Näiden aiempien tutkimusten ja nyt tehdyn kokeen satomäärät saatiin yhdellä niitolla. Tiken (2012) tilastojen mukaan koko kasvukauden aikana korjatun nurmipohjaisen säilörehun tuoresadot ovat Suomessa vuosina 2006–2011 olleet 13 270–18 990 kg/ha/vuosi. Nyt tehdyn tutkimuksen perusteella valkolupiini-vehnäkokoviljasäilörehun tuoresato voi yhdellä niitolla olla jopa 40 000 kg/ha.

Raakavalkuaissato oli kaikissa kasvuasteissa noin 1000 kg/ha, mikä on kaksi kertaa suurempi kuin rypsin siementen keskimääräinen hehtaarikohtainen valkuaissato (500 kg/ha) Suomessa (Peltonen-Sainio ym. 2011). Karkearehun valkuaisen laatu ei kuitenkaan ole yhtä hyvä kuin rypsin. Lupiinin ja vehnän seoskasvujen raakavalkuaissato ei eronnut

kovin paljon Borreanin ym. (2009) raportoimasta puhtaan valkolupiinin raakavalkuaissadosta, joka oli 1150 kg/ha.

Kasvuasteella 3 vehnän jyvät varisivat niitettäessä, siitäkin huolimatta, että niitto tehtiin käsin ja se oli siten hellävaraisempaa kuin normaali koneellisesti tehty korjuu. Todennäköisesti vehnä oli kolmannessa kehitysasteessa liian kehittynyttä kokoviljasäilörehun tekoa ajatellen. Varisemistappiot saattoivat alentaa hieman kolmannen kasvuasteen satomäärää. Kolmannen kasvuasteen satomäärä mitattiin sekä Amaretto- että Quarna-kasvustosta 2m² kehitysastenäytteen perusteella, joten kasvustojen epätasaisuus saattoi vaikuttaa paljonkin mitattuun satomäärään. Varisemistappiot pienentävät tähkän osuutta koko kasvustosta. Tämä havaittiin kolmannessa kehitysasteessa molemmissa vehnäkasvustoissa, joissa tähkän osuus pieneni 7–10 prosenttiyksikköä toiseen kehitysasteeseen verrattuna. Vehnän *in vitro* -sulavuudessa ei kuitenkaan tapahtunut muutoksia koko kokeen aikana.

Valkolupiinin palkojen osuus oli vähäinen aiempiin tutkimuksiin verrattuna. Fraserin ym. (2005) tutkimuksessa valkolupiinin palkojen osuus lisääntyi lineaarisesti kasvuston vanhetessa ja lajike vaikutti kasvin eri fraktioiden (palko, lehdet, varret) osuuksiin. Palkojen osuus oli suurimmillaan 60 % koko kasvista kevätkuotoisessa lajikkeessa 18,5 viikon kuluttua kylvöstä. Fraserin ym. (2005) tutkimuksessa ei kuitenkaan ollut kerrottu missä yksikössä fraktiointien osuudet oli ilmaistu. Borreanin ym. (2009) tutkimuksessa valkolupiinin palkojen osuus koko kasvista (20 % kuiva-aineesta) oli edellä mainittua pienempi, mutta kuitenkin suurempi kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa. Borreanin ym. (2009) tutkimuksessa valkolupiinin kanssa samaan aikaan korjattujen herneen ja härkäpavun palkojen osuudet olivat valkolupiinia suuremmat, ollen 60 % ja 44 % koko kasvista kuiva-aineessa.

6.2 Raaka-aineen koostumus

Kuiva-aine

Valkolupiinin kuiva-ainepitoisuus oli erittäin pieni kaikissa kehitysasteissa. Toisessa kehitysasteessa kuiva-ainepitoisuutta vähensi myös hyvin sateinen sää juuri ennen rehuntekoa. Myös Borreani ym. (2009), Jones ym. (1999) ja Fraser ym. (2005) raportoivat esikuivattamattoman valkolupiinin olevan hyvin märkää (kuiva-ainepitoisuus 129–165

g/kg). Bruno-Soaresin ja Vazin (2000) tutkimuksessa esikuivaamattoman valkolupiinin kuiva-ainepitoisuus oli aiempia tutkimuksia korkeampi (182 g/kg). Esikuivaus olisi voinut helpottaa säilöntää erityisesti valkolupiinin osalta tässä kokeessa. Borreanin ym. (2009) ja Fraserin ym. (2005) tutkimuksissa valkolupiinin kuiva-ainepitoisuus jäi esikuivauksesta huolimatta kuitenkin alle 200 g/kg. Borreani ym. (2009) myös raportoivat valkolupiinin kuivuvan hitaammin kuin herneen ja härkäpavun, eikä esikuivauksella ollut vaikutusta valkolupiinin koostumukseen kuiva-ainepitoisuutta lukuun ottamatta.

Vehnän kuiva-ainepitoisuus oli kaikissa kehitysasteissa yli kaksinkertainen (kolmannessa kehitysasteessa yli kolminkertainen) valkolupiiniin nähden. Tämä helpotti kasvustoista muodostettujen seosten säilöttävyyttä. Viljojen kuiva-ainepitoisuus lisääntyy kasvuston vanhetessa (Bergen ym. 1991, Nadeau 2007, Jaakkola ym. 2009). Näin ei kuitenkaan käynyt tässä tutkimuksessa, vaan toisessa kehitysasteessa vehnän kuiva-ainepitoisuus oli hieman pienempi kuin ensimmäisessä kehitysasteessa sateisten korjuuolosuhteiden vuoksi. Valkolupiinista ja vehnästä muodostettujen seosten kuiva-ainepitoisuus ylitti 300 g/kg ka vain rehussa K1S1. Valkolupiinivaltaisemmat seokset olivat märempiä kuin vehnävaltaisemmat. Klostriidien kasvu rajoittuu rehun kuiva-ainepitoisuuden ylittäessä 300 g/kg. Tämän vuoksi märemmät rehut ovat alttiimpia voihiappokäymiselle. (McDonald ym. 1991). Vehnän koostumuksessa kasvukauden edetessä tapahtuneet muutokset vastasivat kaikkien muiden parametrien kuin kuiva-aineen osalta aiempia tutkimustuloksia vehnäkokoviljasäilörehun raaka-aineen koostumuksesta (Nadeau 2007, Jaakkola ym. 2009).

Tuhka

Aikaisemmissa tutkimuksissa valkolupiinin tuhkapitoisuus on vaihdellut 42–115 g/kg ka välillä (Jones ym. 1999, Bruno-Soares ym. 2005a, Bruno-Soares ja Vaz 2000, Borreani ym. 2009, Deaville ja Givens 2002 ja Peiretti ym. 2010). Tutkimusten välinen vaihtelu on varsin suurta. Aiempiin tutkimuksiin verrattuna nyt tehdyn tutkimuksen valkolupiinin tuhkapitoisuus oli keskimääräistä tasoa. Puna-apilan tuhkapitoisuus on suomalaisissa tutkimuksissa vaihdellut välillä 65–126 g/kg ka (Tuori ym. 2006). Bergenin ym. (1991), Nadeaun (2007) ja Filyan ym. (2000) tutkimuksissa vehnän tuhkapitoisuus on ollut 70–93 g/kg ka. Valkolupiinin tuhkapitoisuudessa ei tapahtunut juurikaan muutoksia kasvuston vanhetessa. Sen sijaan vehnän tuhkapitoisuus pieneni, vaikka Bergenin ym. (1991) mukaan kasvuaste ei vaikuta vehnän tuhkapitoisuuteen.

Kasvien tuhkapitoisuuteen vaikuttavat mm. kasvilaji, kasvin kehitysaste, maaperän pH ja kivennäisten määrä, niiden liukoisuus ja kemiallinen muoto, sekä ilmaston lämpötila ja kosteus (Spears 1994). Kasvin vanhetessa sen soluseinäaineen osuus suurenee ja vastaavasti solusisällysaineen osuus pienenee. Myös kasvin lehtien osuus koko kasvusta pienenee. Kivennäisaineista fosfori, rikki ja kalium sijaitsevat solunsisällysaineessa ja vain murto-osa soluseinäaineessa. Nämä seikat johtavat kasvin kivennäispitoisuuden pienenemiseen kasvin vanhetessa. Nurmipalkokasveissa kuitenkin noin puolet kalsiumin kokonaismäärästä voi sijaita solunseinäaineessa. (Whitehead ym. 1985). Tämän vuoksi nurmipalkokasvien kalsiumpitoisuuden vähentyminen kasvin vanhetessa ei ole niin voimakasta, kuin muutokset fosforin ja kaliumin pitoisuuksissa (Spears 1994). Tämä voi myös selittää sen, miksi valkolupiinin tuhkapitoisuudessa ei tapahtunut muutoksia kasvuston vanhetessa.

Richardt (2012) suosittelee hyvälaatuisen ja erittäin hyvälaatuisen karkearehun tuhkapitoisuudeksi alle 120 g/kg ka. Tätä suuremmat tuhkapitoisuudet ovat merkki maakontaminaatiosta rehunteon aikana. Maakontaminaatio lisää rehun patogeenisten bakteerien määrää, puskurikapasiteettia, altistaa rehun voi happokäymiselle ja lisää raskasmetallien elimistöön kertymisen riskiä. (Richardt 2012).

Raakavalkuainen ja liukoinen tyyppi

Lypsylehmien tarpeeseen nähden tässä kokeessa mitatut kaikkien seosten raakavalkuaistasot olivat varsin matalat. Hoffmann (2012, ref. Richardt 2012) suosittelee lypsylehmille syötettävän nurmisäilörehun raakavalkuaispitoisuuden olevan 150–180 g/kg ka. Ummessa olevien lehmien ja yli vuoden ikäisten hiehojen ruokinnassa käytettävän nurmisäilörehun raakavalkuaispitoisuudeksi Hoffmann (2012, ref. Richardt 2012) suosittelee 120–160 g/kg ka. Tähän yltää ainoastaan ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisempi seos (S2). Suomalaisissa suosituksissa karkearehun tavoiteltava raakavalkuaispitoisuus on pienempi, ollen 130–160 g/kg ka ja suositus koskee kaikkia märehijöitä. Pötsimikrobien tarpeisiin riittää noin 130–140 g/kg ka raakavalkuaispitoisuus koko rehuannoksessa. (Artturi 2014).

Valkolupiinin raakavalkuaispitoisuus oli tässä tutkimuksessa keskimääräistä tasoa. Aiemmissa tutkimuksissa valkolupiinin raakavalkuaispitoisuuden on raportoitu vaihtelevan

128–239 g/kg ka välillä (Jones ym. 1999, Bruno-Soares ja Vaz 2000, Deaville ja Givens 2002, Bruno-Soares ym. 2005a, Fraser ym. 2005, Borreani ym. 2009, Peiretti ym. 2010, Azo ym. 2012). Peiretti ym. (2010) havaitsivat valkolupiinin raakavalkuaispitoisuuden vähenevän 0,5 g/kg ka/päivä kasvuston vanhetessa, kun taas Deaville ja Givens (2002) ja Bruno-Soares ja Vaz (2000) eivät havainneet muutoksia kasvuston vanhetessa. Tässä tutkimuksessa kahden ensimmäisen kehitysasteen välillä ei havaittu eroja valkolupiinin raakavalkuaispitoisuudessa. Sen sijaan kolmannessa kehitysasteessa valkolupiinin raakavalkuaispitoisuus oli selvästi kahta aiempaa kehitysastetta pienempi. Toisen ja kolmannen kehitysasteen välillä valkolupiinin raakavalkuaispitoisuus vähentyi noin 1,7 g/kg ka/päivä. Fraserin ym. (2005) mukaan kasvuston kehitysaste ei vaikuta valkolupiinin lehtien, varren eikä palkojen raakavalkuaispitoisuuteen. Sen sijaan näiden kasvinosien raakavalkuaispitoisuudessa on eroa. Näin ollen muutokset kasvuston raakavalkuaispitoisuudessa johtuvat siis kasvin eri osien suhteiden muutoksesta. Tämä tukee myös nyt tehdyn kokeen tuloksia, sillä Amaretto-kasvuston valkolupiinin palkojen osuus koko kasvustosta kääntyi laskuun kolmannessa kasvuasteessa. Samanaikaisesti myös valkolupiinin raakavalkuaispitoisuus pieneni. Valkolupiinin raakavalkuaispitoisuus oli kaikissa kehitysasteissa suurempi kuin vehnän, jonka vuoksi seoksen valkolupiinipitoisuutta lisättäessä myös seoksen raakavalkuaispitoisuus lisääntyi.

Säilörehun liukoisia tyyppiyhdisteitä ovat lyhytketjuiset peptidit, ammoniakki, ei-haihtuvat amiinit ja aminohapot. Liukoinen tyyppi on potentiaalisesti pötsihajoava. Sen ravitsemuksellinen arvo ei kuitenkaan yleensä toteudu, koska liukoinen tyyppi muunnetaan pötsissä tavallisesti nopeasti ammoniakiksi, joka imeytyy verenkiertoon ja eritetään pois ureana. Osa liukoisesta tyypestä kuitenkin päättyy ohutsuoleen, jossa liukoisen typen ravitsemuksellinen arvo riippuu sen aminohappoprofiilista. Tavallisesti eläinten tuotoksen on havaittu paranevan, kun rehun liukoisen typen osuus on vähentynyt. (Givens ym. 2000).

Aiemmissa valkolupiinitutkimuksissa valkolupiinin tai siitä tehdyn säilörehun liukoisen typen osuus on ollut vaihteleva. Bruno-Soaresin ym. (2005a) kokeessa tuoreen valkolupiinin liukoisen typen osuus oli 152 g/kg N, mikä on pienempi, kuin nyt tehdyssä kokeessa. Valkolupiinisäilörehussa pitoisuudet ovat puolestaan olleet 552 g/kg N (Kochapakdee ym. 2002) ja 183–230 g/kg N säilöntäainekäsittelystä riippuen (Bruno-Soares ym. 2005a, 2005b). Nämä määrät ovat kuitenkin pieniä verrattuna

sinimailassäilörehun liukoisen typen osuuteen, joka voi olla jopa yli 700 g/kg N (Đorđević ym. 2011). Suomessa nurmisäilörehun tavoitteellinen liukoisen typen osuus kokonaistypestä on alle 400 g/kg N (Artturi 2014).

NDF

Kaikkien rehuerien neutraalidetergenttikuidun (NDF) pitoisuudet olivat varsin korkeita saksalaiseen suositukseen nähden. Hoffmann (2012, ref. Richardt 2012) suosittelee nautojen ruokinnassa käytettävän nurmisäilörehun NDF-pitoisuudeksi 400–450 g/kg ka, kun ruokinta on karkearehuvaltaista. Lähimmäksi tätä ylsi ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisempi seos (S2), jossa NDF-pitoisuus oli 460 g/kg ka. Tyypillisesti nurmisäilörehun NDF-pitoisuus on Suomessa noin 540–580 g/kg ka, apilapitoisessa rehussa jonkin verran vähemmän (noin 450–550 g/kg ka). Suomalaisissa suosituksissa ei ole asetettu tavoitearvoa karkearehun kuitupitoisuudelle, vaan koko rehuannoksen kuitupitoisuus ratkaisee. Koko rehuannoksen karkearehun kuidun minimipitoisuutena pidetään 25 % kuiva-aineen syönnistä. (Artturi 2014).

Valkolupiinin NDF-pitoisuus oli tässä kokeessa keskimääräistä tasoa verrattuna aiempiin tutkimuksiin, joissa valkolupiinin NDF-pitoisuus on vaihdellut välillä 314–595 g/kg ka (Jones ym. 1999, Bruno-Soares ja Vaz 2000, Deaville ja Givens 2002, Bruno-Soares ym. 2005, Fraser ym. 2005, Peiretti ym. 2010). Tässä tutkimuksessa valkolupiinin NDF-pitoisuus lisääntyi kasvuston vanhetessa, mikä on yhtenevä aiempien tutkimusten kanssa (Deaville ja Givens 2002, Peiretti ym. 2010). Tämä voi johtua varren osuuden lisääntymisestä, sillä Fraser ym. (2005) havaitsivat lupiinin fraktioista (lehdet, palot, varret) varren NDF-pitoisuuden olevan kaikkein suurin. Bruno-Soares ja Vaz (2000) eivät kuitenkaan havainneet muutosta valkolupiinin NDF-pitoisuudessa kasvuston vanhetessa. Tähän voi vaikuttaa valkolupiinin kehitysvaihe ja lajike, sillä eri lajikkeiden kehitysrytmi on erilainen (Fraser ym. 2005). Peirettin ym. (2010) tutkimuksessa NDF-pitoisuus lisääntyi 4,6 g/kg ka/päivä ja nyt tehdyssä tutkimuksessa NDF-pitoisuus lisääntyi 3,3 ja 4,9 g/kg ka/päivä kehitysasteen 1 ja 2 sekä kehitysasteen 2 ja 3 välillä. Vehnän NDF-pitoisuudessa ei tapahtunut muutoksia kasvukauden edetessä, minkä myös Jaakkola ym. (2009) havaitsivat tutkimuksessaan. Vehnän NDF-pitoisuus oli kaikissa kasvuasteissa suurempi, kuin valkolupiinin, minkä vuoksi lupiinipitoisuuden lisääminen pienensi seoksen NDF-pitoisuutta.

Sokeri ja tärkkelys

Lupiinin sokeripitoisuus on yleisesti pieni. Vihermassan kokonaissokerin osuuden on raportoitu olevan noin 100 g/kg ka (Aniszewski 1985). Valkolupiinin sokeripitoisuuksia on raportoitu vain muutamassa aiemmassa tutkimuksessa. Deaville ja Givens (2002), Fraser ym. (2005) ja Jones ym. (1999) havaitsivat valkolupiinin sokeripitoisuuden olevan 28–165 g/kg ka kasvukauden eri vaiheissa. Tässä tutkimuksessa mitatut sokeripitoisuudet mahtuvat tämän vaihteluvälin sisälle. Aniszewskin (1985) mukaan valkolupiinikasvuston vanhetessa myös sen sokeripitoisuus pienenee. Näin kävi myös nyt tehdyssä tutkimuksessa.

Valkolupiinin koko kasvuston tärkkelyspitoisuudesta ei löytynyt aiempaa tutkimustietoa. Tässä tutkimuksessa valkolupiinin tärkkelyspitoisuus vaihteli välillä 12,3–30,4 g/kg ka ja pitoisuus pieneni selvästi kasvuston vanhetessa. Lupiinien siementen tärkkelyspitoisuus on tyypillisesti erittäin vähäinen (Pettersen ym. 1997 ref. Pettersen 2000). Doležal ym. (2008) raportoivat kuitenkin keltalupiinisäilörehun raaka-aineen sisältävän tärkkelystä jopa 140 g/kg ka. Muihin palkokasveihin verrattuna tässä kokeessa mitatut valkolupiinin koko kasvin tärkkelyspitoisuudet ovat erittäin pieniä. Pursiaisen ja Tuorin (2008) tutkimuksessa härkäpavun, herneen ja rehuvirnan koko kasvin tärkkelyspitoisuudet olivat 185, 255 ja 161 g/kg ka. Tyypillisesti viljojen sokeripitoisuus pienenee kasvuston vanhetessa ja tärkkelyspitoisuus puolestaan lisääntyy (Nadeau 2007, Jaakkola ym. 2009). Tämä havaittiin myös nyt tehdyssä tutkimuksessa. Seoksen lupiinipitoisuuden lisääntyessä sokeripitoisuus lisääntyi ja tärkkelyspitoisuus puolestaan vähentyi. Korjuun myöhentäminen vaikutti päinvastoin.

Sokeripitoisuuden perusteella ensimmäisen kasvuasteen seokset olivat kohtuullisen vaikeasti säilöittäviä (sokeripitoisuus $15 \leq x \leq 30$ g/kg tuoreesta) ja toisen kasvuasteen seokset vaikeasti säilöittäviä (sokeripitoisuus < 15 g/kg tuoreesta) (EFSA 2006). Haigh ja Parker (1985) havaitsivat raiheinän ja valkoapilan seosten ja timotein ja nurminadan seosten säilönnässä tarvittavan sokeria vähintään 30 g/kg, jos säilönnässä ei käytetty säilöntäainetta. Muurahaishapolla säilöittäessä sokerin vähimmäistarve oli hieman pienempi, 25 g/kg. Nyt tehdyn tutkimuksen sokeripitoisuudet olivat selvästi näitä lukuja pienempiä kaikissa rehuerissä, ollen 27,94, 24,21, 12,26 ja 11,87 g/kg (K1S1, K1S2, K2S1 ja K2S2). Haighin ja Parkerin (1985) antamat sokeripitoisuuden minimimäärät eivät

kuitenkaan ota huomioon raaka-aineen kuiva-ainepitoisuutta ja puskurikapasiteettia, jotka myös vaikuttavat säilönnässä tarvittavan sokerin määrään (Muck 1988).

In vitro -sulavuus ja energia-arvo

Valkolupiinin ja vehnän seosten *in vitro* -sulavuus oli matala. Suomalaisten suositusten mukaan karkearehun tavoitteellinen D-arvo on 680–700 g/kg ka, jos nurmiala ei rajoita maidontuotantoa (Artturi 2014). Kasvuston kehitysvaihe säilönnän aikana on tärkein säilörehun sulavuuteen vaikuttava tekijä. Sulavuuden pienentyminen kasvuston vanhentuessa johtuu pääosin rakenteellisten hiilihydraattien määrän lisääntymisestä. Rakenteelliset hiilihydraatit ovat vähemmän sulavia kuin kasvien liukoiset osat. Myös kasvin ligniinin määrällä on suuri merkitys, sillä pötsin mikro-organismit eivät kykene hydrolysoimaan ligniiniä. Soluväliaineen ligniinimäärä vaikuttaa siihen, kuinka hyvin kasvimateriaali on suojassa pötsin hajotustoiminnalta. (Ben-Ghedalia ja Rubinstein 1985, ref. McDonald ym. 1991) Nyt tehdyssä tutkimuksessa valkolupiinin sulavuus pienenikin noin 20 g/kg ka jokaisen kasvuasteen välillä. Vehnän sulavuudessa ei sen sijaan tapahtunut muutoksia. Seosten välinen ero oli suurimmillaan ensimmäisessä kehitysasteessa, jossa ero oli 12 g/kg ka lupiinipitoisemman seoksen hyväksi. Vapaalla säilörehuruokinnalla D-arvon nousu 10 g/kg ka lisää rehun syöntiä noin 0,175 kg ja maitotuotosta 0,4–0,5 kg päivässä. Vastaava tuotoslisäys saadaan kilon väkirehuannoksella päivässä. (Artturi 2014). Valkolupiinin D-arvo laskettiin sekä puna-apilan kaavalla että kaikille rehuille tarkoitetulla yleiskaavalla. Yleiskaavan havaittiin kaikissa kasvuasteissa tuottavan puna-apilan kaavaa suuremmat D-arvot.

Valkolupiinin koko kasvuston sulavuutta on tutkittu vain muutamassa aiemmassa tutkimuksessa. Deavillen ja Givensin (2002) tutkimuksessa syysmuotoisen valkolupiinin *in vitro* -sulavuus oli 527–621 g/kg ka kasvukauden eri vaiheissa, kun kasvusto kylvettiin lokaluussa ja sen koostumus analysoitiin seuraavan vuoden kesä-, heinä- ja elokuussa. Peirettin ym. (2010) tutkimuksessa kevätmuotoisen valkolupiinin *in vitro* -sulavuus oli aiempaa tutkimusta hieman korkeampi, eli 615–693 g/kg ka. Deavillen ja Givensin (2002) tutkimuksessa ei määritetty valkolupiinin kasvuastetta. Peirettin ym. (2010) tutkimuksessa valkolupiinin kehitystä seurattiin kukinnan loppuvaiheesta siihen saakka, että palot olivat nuoria ja vihreitä. Tässä tutkimuksessa mitatut valkolupiinin ensimmäisen kehitysasteen sulavuudet olivat melko lähellä Peirettin ym. (2010) vanhimpien valkolupiinikasvustojen sulavuuksia. Myös tämän tutkimuksen ensimmäinen kehitysaste oli todennäköisesti melko

lähellä Peirettin ym. (2010) tutkimuksen vanhinta kehitysastetta. Sheldrick ym. (1980) raportoivat kevätmuotoisen valkolupiinin sulavuuden olevan elokuun puolivälissä 640 g/kg ka ja sulavuus kohosi heidän tutkimuksessaan heinäkuun lopusta elokuun puoliväliin saakka. Tämä johtui hyvin sulavien palkojen ja siementen määrän lisääntymisestä kasvustossa. Valkolupiinin kehitysastetta ei raportoitu tutkimuksessa.

Palkokasvien NDF-pitoisuus on pienempi ja sulavan NDF:n pötsihajoavuus on suurempi kuin nurmiheinäkasvien. Tämän vuoksi kasvilajien *in vitro* -sulavuuksien ollessa sama palkokasvien potentiaalisesti sulavan NDF:n pitoisuudet ovat pienempiä kuin nurmiheinäkasvien. (Weisbjerg ja Søgaard 2008). Tämä havaittiin myös nyt tehdyssä tutkimuksessa. Kolmannessa kasvuasteessa valkolupiinin ja vehnän sulavuudessa ei havaittu eroa, kun valkolupiinin D-arvo laskettiin puna-apilan sulavuuskaavalla ja vehnän kokoviljasäilörehun kaavalla. Sen sijaan valkolupiinin NDF-pitoisuus oli selvästi vehnää pienempi.

Lypsylehmien tarpeisiin nähden tämän kokeen *in vitro* -määrittelykseen perustuva rehuerien ME-pitoisuus oli matala. Hoffmann (2012, ref. Richardt 2012) suosittelee hyvälaatuisen ja erittäin hyvälaatuisen säilörehun energia-arvoksi 10,3–11,3 MJ/kg ka, kun lypsylehmien ruokinta on karkearehupainotteinen. Nyt tehdyn tutkimuksen rehut soveltuvatkin pelkästään energiasisällön perusteella arvioituna paremmin ummessa olevien lypsylehmien ja yli vuoden ikäisten hiehojen ruokintaan, joiden energiantarve on lypsylehmiä matalampi. Hoffmann (2012, ref. 2012) suosittelee näiden eläinryhmien ruokinnassa käytettävän hyvälaatuisen ja erittäin hyvälaatuisen karkearehun energiasisällöksi 9,2–10,0 MJ/kg ka. Kuitenkin myös rehun syönti vaikuttaa eläimen energiansaantiin.

Nyt tehdyn tutkimuksen valkolupiinin energia-arvot vastaavat hyvin aiempia valkolupiinitutkimuksia, joissa valkolupiinin muuntokelpoisen energian määrä on vaihdellut 7,8–9,4 ME MJ/kg ka kasvukauden eri vaiheissa (Murphy ym. 1993, Deaville ja Givens 2002). Peiretti ym. (2010) raportoivat eri kasvuvaiheissa olevan valkolupiinin bruttoenergiasisällön olevan 17,3–17,5 GE MJ/kg ka ja maidontuotantoon käytettävissä olevan nettoenergian 4,9–5,5 NE_L MJ/kg ka. Myös Doležal ym. (2008) raportoivat samantasoisia tuloksia puhtaan keltalupiinisäilörehun osalta (9,40–9,59 ME MJ/kg ka; 5,51–5,59 NE_L MJ/kg ka). Myös näiden raportoitujen maidontuotantoon käytettävissä

olevan nettoenergiapitoisuuksien perusteella valkolupiinisäilörehut soveltuvat parhaiten ummessa olevien lypsylehmien ja yli vuoden ikäisten hiehojen ruokintaan (Hoffmann 2012, ref. Richardt 2012). Sen sijaan Dawsonin (2012) ruokintatutkimuksessa käytetyn keltalupiini-ruisvehnäkokoviljasäilörehun energiasisältö oli puhtaita valkolupiinisäilörehuja hieman korkeampi, ollen 9,0–10,4 ME MJ/kg ka. Tämä saattaa johtua keltalupiinin suuremmasta energiasisällöstä. Fychanin ym. (2002) mukaan puhtaan keltalupiinisäilörehun sulavan energian määrä on ollut 10,6–11,2 ME MJ/kg ka. Tämä energiamäärä riittäisi jo kattamaan lypsylehmienkin tarpeet.

Alkaloidit

Valkolupiinin lupaniinipitoisuudet olivat pieniä verrattuna Kochapakdeen ym. (2002) tutkimukseen, jossa valkolupiinisäilörehun lupaniinipitoisuus oli 1,5 g/kg ka. Lupaniini on yksi kinolitsidiialkaloidien muoto ja sen osuus kaikista kinolitsidiini-alkaloideista on valkolupiinin lehdistä 50 % ja siemenissä 70 %. (Wink ym. 1995). Lupiinissa esiintyvät kinolitsidiini-alkaloidit ovat lysiinin aineenvaihduntatuotteita, ja ne toimivat yhdessä aminohappojen ja biogeenisten amiinien kanssa kasvien typpivarantoina (Aniszewski ym. 2001). Kinolitsidiini-alkaloidit eivät ole ainoita lupiinien sisältämiä alkaloideja, mutta ihmisten ja eläinten terveyden suhteen niillä on alkaloideista suurin merkitys (Australia New Zealand Food Authority 2001).

Valkolupiinin lupaniinipitoisuus pieneni kasvuston vanhetessa. Bruno-Soares ja Vaz (2000) raportoivat valkolupiinin (lajike Estoril) koko kasvin alkaloidipitoisuuden olevan 0,27–1,08 g/kg ka, eikä kasvuasteen havaittu vaikuttavan valkolupiinin alkaloidipitoisuuteen. Sen sijaan sinilupiinin alkaloidipitoisuus väheni kasvukauden edetessä (Bruno-Soares ja Vaz 2000). Rotilla ravinnon alkaloiditaso 0,09–0,105 g/elopaino kg/päivä ei ole havaittu aiheuttavan minkäänlaisia vaikutuksia (No-observable-effect-level, NOEL) (Australia New Zealand Food Authority 2001). Jos tämä määrä suhteutetaan suoraan 550 kg painavaan lypsylehmään, niin ravinnon alkaloiditaso voisi silloin olla 49,5–57,8 g/pv. Australiassa lupiinien siementen alkaloidipitoisuus saa olla enimmillään 0,2 g/kg ka (Australia New Zealand Food Authority 2001). Gefrom ym. (2013) havaitsivat maitohappobakteereilla säilömisen alentavan sinilupiinin siementen oligosakkaridipitoisuutta. Säilönnällä ei havaittu olevan vaikutusta lupiinien siementen alkaloidipitoisuuteen.

Puskurikapasiteetti

Puskuroinnilla tarkoitetaan liuoksen kykyä vastustaa pH:n muuttumista, kun liuokseen lisätään (tai siitä vähennetään) happoa tai emästä (Clark 1920, ref. Giger-Reverdin ym. 2002). Rehun raaka-aineen luonnollinen puskurikapasiteetti siis tarkoittaa tämän rehun kykyä vastustaa pH:n muutosta happaman tai emäksisen liuoksen lisäämisen jälkeen (Giger-Reverdin ym. 2002). Valkolupiinin puskurikapasiteettia on mitattu vain kahdessa aiemmassa tutkimuksessa (Fraser ym. 2005, Jones ym. 1999). Näissä valkolupiinin puskurikapasiteetit olivat 304–389 mEq/kg. Nyt tehdyssä tutkimuksessa valkolupiinin puskurikapasiteetti oli 687–709 mEq/kg ka. Fraserin ym. (2005) ja Jonesin ym. (1999) tutkimustuloksissa kiinnittää huomiota valkolupiinin puskurikapasiteetin pienuus. Nyt tehdyssä tutkimuksessa valkolupiinin puskurikapasiteetti on noin kaksinkertainen Fraserin ym. (2005) ja Jonesin ym. (1999) tutkimuksiin verrattuna. Myös puskurikapasiteetin mittaussyksikön (mEq/kg) perusteella on epäselvää, onko mittaustulos ilmoitettu pitoisuutena tuoreessa rehussa vai kuiva-aineessa. Fraserin ym. (2005) ja Jonesin ym. (1999) mittaama valkolupiinin puskurikapasiteetti on samaa tasoa kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa mitattu vehnän puskurikapasiteetti. Weissbach ym. (1974) raportoivat keltalupiinin puskurikapasiteetin olevan 511 mEq/ka ka. Pursiainen ja Tuori (2008) mittasivat härkäpavun, herneen, rehuvirnan ja vehnän puskurikapasiteeteiksi 588, 710, 755 ja 344–477 mEq/kg ka. King ym. (2012) raportoivat puna-apilan puskurikapasiteetin olevan 552–639 mEq/kg ka eri kehitysasteissa. Bergen ym. (1991) tutkimuksessa kokoviljasäilörehujen raaka-aineen puskurikapasiteetit olivat vielä Pursiaisen ja Tuorinkin (2008) mittaustuloksia pienempiä, ollen eri viljoilla eri tuleentumisasteissa 166–285 mEq/kg ka. Näiden tulosten perusteella nyt tehdyssä tutkimuksessa mitatut valkolupiinin puskurikapasiteetit olivat palkokasveille tyypillisellä tasolla.

Fraser ym. (2005) käyttivät puskurikapasiteetin määrittämisessä eri menetelmää (Playne ja McDonald 1966) kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa ja Tuorin ja Pursiaisen (2008) tutkimuksessa (Weissbach 1992). Jones ym. (1999) eivät maininneet käyttämänsä puskurikapasiteetin analysointimenetelmää. Myös Kingin ym. (2012) puna-apilan puskurikapasiteetit on määritetty Playnen ja McDonaldin (1966) menetelmällä. Weissbachin (1992) menetelmässä rehu titrataan 0,1-M maitohapolla pH 4 saakka. Puskurikapasiteetti lasketaan titraukseen kuluneen maitohapon perusteella. Playnen ja McDonaldin (1966) menetelmässä näyte titrataan ensin 0,1-M suolahapolla pH 3 saakka, tämän jälkeen näyte titrataan pH 6 saakka 0,1-M natriumhydroksidilla. Tässä

menetelmässä puskurikapasiteetti lasketaan titraukseen kuluneen natriumhydroksidin määrän perusteella. Näiden kahden menetelmän vertailukelpoisuudesta ei löydy tutkimustietoa, mutta Buxton ja O'Kiely (2003) eivät tee eroa näiden kahden määrittystavan välille. On kuitenkin epätodennäköistä, että kahden menetelmän ero olisi näin suuri. Erot valkolupiinin puskurikapasiteeteissa johtuvat siis todennäköisesti eroista sen laskemiseen käytetyissä laskukaavoissa.

Märehtijöiden ruokinnassa käytetyistä rehuista runsaasti valkuaista sisältävien rehujen (raakavalkuaispitoisuus yli 35 %) ja palkokasvien puskurikapasiteetti on kaikkein suurin (Jasaitis ym. 1987). Palkokasvien korkea puskurikapasiteetti johtuu pääosin nurmikasveja suuremmasta orgaanisten happojen ja niiden suolojen määrästä (McDonald ym. 1991). Orgaanisten happojen pitoisuus voi joissakin kasveissa, kuten sinimailasella, olla jopa 100 g/kg ka. Myös rehun suuri ionipitoisuus (erityisesti Ca, Mg, K ja Na) ja tuhkapitoisuus nostavat rehun puskurikapasiteettia (Jasaitis ym. 1987). Näiden lisäksi rehun puskurikapasiteettiin vaikuttavat valkuais- ja tärkkelyspitoisuus, vedenpidätyskyky ja rehun luontainen osmoottinen paine (Giger-Reverdin ym. 2002).

Fermentaatiokerroin

Rehun kuiva-ainepitoisuus ja puskurikapasiteetti vaikuttavat siihen, kuinka paljon maitohappokäymiseen tarvitaan sokeria rehun säilömiseksi (Muck 1988). Näiden tekijöiden vaikutusta rehun säilöttävyyteen voidaan arvioida fermentaatiokertoimen avulla (Schmidt ym. 1971, Weissbach ja Honig 1996 ref. Pursiainen ja Tuori 2008). Fermentaatiokertoimeen vaikuttavat rehuraaka-aineen kuiva-aine- ja sokeripitoisuus ja puskurikapasiteetti. Rehu on sitä helpompi säilöä (korkea fermentaatiokerroin), mitä isompi on sen kuiva-aine ja sokeripitoisuus ja mitä pienempi on sen puskurikapasiteetti. Kun fermentaatiokerroin on yli 45, rehu on helposti säilöttävää, eikä voihappokäyminen tuota ongelmia, jos tämän rehun nitraattipitoisuus on vähintään 1 g NO₃ /kg tuoretta rehua. Voihappokäymisen riski säilönnän aikana on lisääntynyt, kun fermentaatiokerroin on alle 45 tai kun rehun nitraattipitoisuus on alle 1 g NO₃ /kg tuoretta rehua (Weissbach 1999, ref. Pahlow ym. 2002). Fermentaatiokertoimeltaan <35 rehut ovat vaikeasti säilöttäviä (Weissbach ja Auerbach 2012). Voihappokäyminen on väistämätöntä rehuissa, joiden fermentaatiokerroin on alle 27, jos säilönnässä ei käytetä säilöntäainetta (Pahlow ym. 2002).

Kaikkien rehuseosten fermentaatiokertoimet olivat melko pieniä, eikä yksikään ollut yli 45. Kehitysasteella 2 rehuseosten fermentaatiokertoimia laskevat ensimmäistä kehitysastetta pienemmät kuiva-aine- ja sokeripitoisuudet, vaikka valkolupiinin puskurikapasiteetti olikin toisessa kehitysasteessa hieman ensimmäistä pienempi. Mikäli myös toinen kehitysaste olisi korjattu hyvissä sääoloissa, voisivat myös fermentaatiokertoimet olla korkeammat ja säilöntälaatu parempi. Vaikutus olisi johtunut lähinnä suuremmasta kuiva-ainepitoisuudesta. Coblenz ja Muck (2012) havaitsivat yksittäisen sadekuuron vaikuttavan vain vähän ennestään jo melko märän rehuraaka-aineen säilöntälaatuun vaikuttaviin tekijöihin (rehun pH, sokeri- ja tärkkelyspitoisuus, puskurikapasiteetti), kun sadetta seuraa rehun nopea kuivuminen. Säilöntälaadun varmistaminen on haastavampaa, kun sade on pitkäaikaista, useamman päivän kestävä ja kun kuivausolosuhteet ovat märät.

Puhtaan valkolupiinin fermentaatiokertoimet olivat kaikkein pienimpiä ja vehnän lisääminen seokseen nosti fermentaatiokerrointa. Valkolupiinin fermentaatiokerrointa laskee sen pieni kuiva-ainepitoisuus ja suuri puskurikapasiteetti. Esikuivauksen on todettu parantavan valkolupiinin säilöttävyyttä (Fraser ym. 2005, Borreani ym. 2009). Jones ym. (1999) kuitenkin havaitsivat esikuivauksen nostavan myös valkolupiinin puskurikapasiteettia. Esikuivaus olisi voinut parantaa säilöntätuloksia myös tässä kokeessa. Esikuivaus kuitenkin lisää kokoviljasäilörehun korjuutappioita suoraan kasvustosta korjaaviin menetelmiin verrattuna. Korjuutappiot kohdistuvat etenkin viljaan, joka on epätasaisesti valmistuneessa kasvustossa pisimmälle tuleentunut. Jos sääolosuhteet ovat lisäksi korjuun kannalta epäedulliset, esikuivaus voi entisestään vaarantaa laadukkaan sadon saamisen. (Suokannas ym. 2003).

Tyypillisesti nuorempana korjatun kasvuston kuiva-ainepitoisuus on pienempi ja puskurikapasiteetti suurempi kuin vanhemman kasvuston (Buxton ja O'Kiely, 2003). Myös tässä tutkimuksessa vanhemman lupiinikasvuston (kasvuaste 2) puskurikapasiteetti oli pienempi kuin nuoremman kasvuston (kasvuaste 1). Vehnän puskurikapasiteetissa ei tapahtunut muutoksia. Kuitenkin sääoloista johtuen toisen kehitysasteen kasvusto oli todella märkää, minkä vuoksi fermentaatiokertoimet olivat ensimmäistä kehitysastetta pienempiä pienemmästä valkolupiinin puskurikapasiteetista huolimatta. Myös molempien kasvustojen sokeripitoisuudet olivat toisessa kehitysasteessa n. 50 g/kg ka pienempiä kuin ensimmäisessä kehitysasteessa. Sekä fermentaatiokertoimen, kuiva-ainepitoisuuden,

puskurikapasiteetin että sokeripitoisuuden perusteella kaikki rehuseokset olivat vaikeita säilöttäviä.

Säilönnän alkuvaiheissa enterobakteerit pelkistävät nitraattia nitriitiksi, joka ehkäisee klostridien kasvua (Spoelstra 1983, McDonald ym. 1991). Weissbachin ja Honigin (1996, ref. Pursiainen ja Tuori 2008) mukaan rehussa tarvitsee olla nitraattia vähintään 0,5 g/kg ka voihappokäymisen ehkäisemiseksi, kun fermentaatiokerroin on yli 35. Rehuraaka-aineiden nitraattipitoisuutta ei mitattu tässä tutkimuksessa. Fraser ym. (2005) raportoivat valkolupiinin nitraattipitoisuuden olevan 0,134–0,437 g/kg ka korjuuajankohdasta ja lajikkeesta riippuen. Pursiaisen ja Tuorin (2008) tutkimuksessa härkäpavun, herneen, rehuvirnan ja vehnän nitraattipitoisuudet olivat 0, 0,24, 0,24–0,60 ja 1,2–2,4 g/kg ka. Heidän tutkimuksessaan riittävä nitraattimäärä ja yli 35 oleva fermentaatiokerroin saavutettiin, kun vehnän osuus rehuseoksessa oli yli 25 % tuorepainosta. Tässä tutkimuksessa vehnän osuus oli 33 ja 66 % tuorepainosta seoksissa 1 ja 2. Tosin kaikkien rehuseosten fermentaatiokertoimet olivat alle 35. Jos oletetaan vehnän ja valkolupiinin nitraattipitoisuuksien olevan Pursiaisen ja Tuorin (2008) ja Fraserin ym. (2005) tutkimuksien perusteella keskimääräinen (lupiini 0,286 g/kg ka, vehnä 1,8 g/kg ka), nyt tehdyn tutkimuksen vehnävaltaisempien seosten nitraattipitoisuus voisi olla noin 1,5 g/kg ka ja lupiinivaltaisempien seosten noin 1,1 g/kg ka. Nämä luvut tuskin kuitenkaan pitävät paikkaansa, sillä nyt tehdyn tutkimuksen koejärjestelyt erosivat edellä mainittujen tutkimusten koejärjestelyistä. Lisäksi mineraalitypen lannoitustaso vaikuttaa kasvien nitraattipitoisuuteen (Weiss ym. 2006). Raaka-aineen nitraattipitoisuus olisi pitänyt mitata myös nyt tehdyssä tutkimuksessa, jotta rehun säilöttävyyttä ja säilöntälaatua olisi voinut tarkastella syvemmin nitraattipitoisuuden kautta.

Seosten mikro-organismit

Raaka-aineista muodostettujen seosten *Lactobacillus*- ja *Enterococcus*-maitohappobakteerien määrä oli suuri. Tavallisesti säilörehun maitohappobakteerien määrä on 10^1 – 10^6 pmy/g tuoretta rehua (Pahlow ym. 2003). Yllä mainittujen lajien lisäksi säilörehussa esiintyviin maitohappobakteereihin kuuluu myös *Pediococcus*-, *Lactococcus*-, *Streptococcus*- ja *Leuconostoc*-lajien bakteereita (Pahlow ym. 2003). *Lactobacillus*- ja *Enterococcus*-bakteerien yhteenlaskettu määrä oli suurempi ensimmäisessä kasvuasteessa, joissa määrät olivat molemmissa seoksissa noin 10^6 geenikopiota/g tuoretta rehua. Jo yksistään näiden maitohappobakteerien määrä oli Pahlowin ym. (2003)

mainitseman maitohappobakteerien tavallisen määrän ylärajalla. Kun huomioidaan myös muut maitohappobakteerit, joiden määrää ei määritetty tässä tutkimuksessa, todennäköisesti maitohappobakteerien kokonaismäärä ylitti 10^6 geenikopiota/g tuoretta rehua.

Weissbachin ja Honigin (1996, ref. Pursiainen ja Tuori 2008) mukaan maitohappobakteereita tarvitaan vähintään 10^5 pmy/g tuoretta rehua, kun rehun fermentaatiokerroin on yli 35. Jos sekä rehun nitraattipitoisuus ja maitohappobakteerien lukumäärä ovat pienet, rehu altistuu voi happokäymiselle fermentaatiokertoimesta riippumatta. Tämän perusteella raaka-aineen luonnollinen maitohappobakteerimäärä olisi siis voinut olla riittävä etenkin ensimmäisen kehitysasteen vehnävaltaisemmassa painorehuseoksessa, jossa fermentaatiokerroin oli 32,7.

Raaka-aineen klostridien määrä oli suuri. Kaiser ym. (2002) luokittelevat jo määrän 10^3 klostridi-itiötä/g tuoretta rehua suureksi kontaminaatioksi. Spörndlyn (1995) mukaan tämä määrä on suurin hyväksyttävä klostridi-itiömäärä säilörehussa. Kun säilörehun klostridi-itiömäärä on alle 10^3 klostridi-itiötä/g tuoretta rehua, navetan hyvä perushygienia riittää pitämään maidon klostridi-itiömäärän alle 1 kpl/ml. Kun säilörehun klostridi-itiömäärä on yli 10^5 klostridi-itiötä/g tuoretta rehua, sitä ei tulisi syöttää. Tällöin on lähes mahdotonta estää maidon kontaminoitumista klostridi-itiöistä. (Vissers ym. 2006). Raaka-aineen klostridi-itiömäärä oli alle 10^5 geeniä/g tuoretta rehua kaikissa seoksissa. Raaka-aineen suuri klostridimäärä oli yllättävää, sillä rehu korjattiin sähköseksillä käsin, jolloin pystyttiin takaamaan se, ettei maakontaminaatiota päässyt tapahtumaan. Kokoviljatyypinen rehun raaka-aine saattaa olla alttiimpi voi happeitiökontaminaatiolle kuin nurmirehu. Liu ym. (2013) havaitsivat, että *Clostridium tyrobutyricum* tuotti eniten voi happea, kun kasvatusalustana oli vehnän olki, verrattuna maissin puintijätteisiin, maissikuituun, riisiin akanoihin ja lännenhirssiin.

Castillo ym. (2006) havaitsivat, että reaaliaikainen qPCR yliarvioi mikrobien määrän verrattuna perinteisempiin menetelmiin (4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI)-värjäys ja selektiivinen viljelytekniikka). qPCR-tulokset ilmoitetaan geenikopioiden määränä/g tuoretta näytettä, DAPI-värjäyksen tulokset bakteerien kokonaismääränä/g tuoretta näytettä ja selektiivisen viljelytekniikan tulokset pesäkkeitä muodostavina yksikköinä (pmy)/g tuoretta näytettä. Korrelaatio qPCR:n ja DAPI-värjäyksen välillä on kuitenkin

korkea bakteerien kokonaismäärän osalta ($r=0,70$), kuin myös qPCR:n ja selektiivisen viljelytekniikan välillä maitohappobakteerien osalta ($r=0,48$). Enterobakteerien osalta menetelmien välinen korrelaatio ei ollut merkitsevä. Erot menetelmien välillä voivat johtua siitä, että qPCR monistaa myös kuolleet solut, jotka eivät kasva viljelmissä, ja siitä, että DAPI-värjäyksessä ja selektiivisessä viljelyssä osa näytteen partikkeleihin kiinnittyneistä bakteereista menetetään. (Castillo ym. 2006).

6.3 Säilöntälaatu

Valkolupiinin ja kevätvehnän seosten säilöntä oli hyvin haastavaa, koska säilöntä ilman säilöntäainetta tuotti huonolaatuista säilörehua kaikissa kehitysasteissa ja seoksissa. Kaikissa painorehuissa esiintyi runsaasti voihippoa ja muita virheikäymiselle tyypillisiä käymishappoja, valkuaisen hajoavuus oli suurta ja jäännössokerin määrä oli vähäinen muihin rehuihin verrattuna. Kaikki säilöntäainekäsittelyt paransivat rehun laatua painorehuun verrattuna. Säilöntäaineiden toimintavarmuudessa havaittiin kuitenkin eroja ja kasvuston kehitysaste ja seokset vaikuttivat eri säilöntäaineiden toimivuuteen. Säilöntäaineiden välisissä vertailuissa tulivat hyvin esiin myös erilaisten säilöntäaineiden erilaiset toimintaperiaatteet. Yhteistä kaikille valmistetuille rehuille oli pieni etikkahapon ja alkoholien määrä, lukuun ottamatta rehua K1S1 alkoholien osalta.

Kaikki rehut olivat maito- ja etikkahappopitoisuudeltaan hyviä rehuja laatuvaatimusten perusteella (MMM 1999). Sen sijaan voihippopitoisuudeltaan hyviä rehuja olivat kasvuasteella 1 ainoastaan NaHe- ja LAB-rehut ja kasvuasteella 2 vain NaHe-rehut. Kasvuasteella 1 kaikki käytetyt säilöntäaineet tuottivat rehuja, joissa ammoniumtypen osuus kokonaistypestä oli hyvä, kasvuasteella 2 ainoastaan NaHe tuotti rehuja, joissa ammoniumtypen osuus kokonaistypestä oli hyvä. Kaikkien painorehujen ammoniumtypen osuudet olivat laatuvaatimusten perusteella liian suuria. Toisen kasvuasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa LAB-rehuissa ammoniumtypen osuus oli tyydyttävän rehun tasolla ja MH-rehujen huonolaatuisen rehun tasolla. Toisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa tilanne oli päinvastainen. Aiempien valkolupiinin säilöntätutkimusten perusteella (taulukko 2) nyt tehdyssä tutkimuksessa saadut säilöntätulokset ovat tyypillisiä. Maito- ja etikkahapon pitoisuudet ovat aiemmissa tutkimuksissa olleet pääasiassa hyviä, kun taas rehun voihippopitoisuus ja ammoniumtypen suuri osuus tuottavat tavallisesti ongelmia.

Voihappopitoisuuden perusteella arvioituna kaikkien rehuerien painorehut ja muurahaishapporehut sekä kasvuasteen 2 LAB-rehu olivat syöntikelvottomia (taulukko 1). Lupiinivaltaisempien seosten NaHe-rehut soveltuvat tietyin rajoituksin useamman kerran poikineille lehmille ja rajoituksetta nuorille eläimille. Kasvuasteen 1 LAB-rehut ja vehnävaltaisemmat NaHe-rehut soveltuvat kaikkien eläinryhmien ruokintaan.

Painorehut

Kun rehun happamuuden lisääntyminen perustuu maitohappobakteereihin, pH kuvastaa sokerin riittävyyttä maitohapon tuotantoon. Tarvittavan sokerin määrään vaikuttavat rehun kuiva-ainepitoisuus ja puskurikapasiteetti (Muck 1988). Kasvuasteella 1 painorehun pH jäi molemmissa seoksissa korkeaksi ja myös voihappopitoisuuden ja ammoniumtypen osuuden perusteella rehut olivat huonolaatuisia. Sen sijaan kasvuasteella 2 molempien seosten painorehujen pH laski alle hyvän rajan ja ammoniumtypen osuus ja voihappopitoisuus olivat ensimmäistä kasvuastetta pienemmät, vaikkakin hyvälaatuisen rehuun nähden edelleen liian korkeat. Tämä siitä huolimatta, että raaka-aineen säilöittävyys oli kasvuasteessa 2 huonompi kuin ensimmäisessä kasvuasteessa.

Ensimmäisen kasvuasteen painorehujen huonompi laatu johtuu todennäköisesti pienemmästä maitohapon pitoisuudesta verrattuna toisen kasvuasteen painorehuihin. Lisäksi kasvuasteella 1 painorehujen maitohapon osuudet kaikista käymishapoista olivat kasvuastetta 2 pienemmät. Maitohapon muodostumiseen vaikuttavat maitohappobakteerien määrä ja niiden käytettävissä oleva substraatin (sokeri) määrä (McDonald ym. 1991). Raaka-aineen sokeripitoisuus oli suurempi kasvuasteella 1, tärkkelyspitoisuus oli vastaavasti suurempi kasvuasteella 2. Suurin osa maitohappobakteereista ei kuitenkaan hyödynnä tärkkelystä substraattinaan (McDonald ym. 1991). Näin ollen substraatin puute on tuskin syynä ensimmäisen kasvuasteen pienempään maitohapon muodostukseen ja sen aiheuttamaan huonompaan säilöntälaatuun.

Raaka-aineen luonnollinen maitohappobakteeripitoisuus oli hieman suurempi ensimmäisessä kasvuasteessa kuin toisessa. Tämäkään ei siis selitä painorehun huonompaa laatua kasvuasteessa 1. Maitohappobakteereja tarvitaan noin 1×10^8 pmy/g, jotta rehun pH laskee välittömästi. Tätä pienemmät määrät laskevat pH:n viiveellä (Muck

1988). Vaikka ensimmäisen kasvuasteen seosten luonnollinen maitohappobakteeripopulaatio oli toista kasvuastetta suurempi ennen säilöntää, saattoi säilönnän aikana ensimmäisessä kasvuasteessa jokin seikka rajoittaa maitohappobakteerien kasvua ja/tai maitohapon muodostusta. Rehun alhainen maitohappopitoisuus voi johtua myös siitä, että haittamikrobit olivat kuluttaneet maitohappoa, jonka seurauksena rehun pH on alkanut nousta (McDonald ym. 1991). Koska valmiista rehuista ei tehty mikrobiologisia määrittäyksiä, tätä teoriaa ei kuitenkaan voida vahvistaa. Raaka-aineesta nyt tehtyjen määrittäysten perusteella ei myöskään pystytä sanomaan, mistä ensimmäisen kasvuasteen maitohapon heikko muodostus johtui. Nitraattipitoisuuden määrittäminen olisi voinut selventää tämän tutkimuksen säilöntätuloksia.

Maitohapon lopullinen pitoisuus ei ollut ensimmäisessä kasvuasteessa riittävää raaka-aineen puskurikapasiteettiin ja säilönnän aikana muodostuneisiin käymistuotteisiin nähden. Jos huomioidaan ainoastaan raaka-aineen puskurikapasiteetti, ensimmäisen kasvuasteen vehnävaltaisemman seoksen maitohappomäärä ei ollut riittävä, jotta rehun pH voisi laskea neljään. Puskurikapasiteettimäärittäyksen mukaan rehuissa tarvittaisiin 33,3, 43,9, 32,8 ja 41,9 g maitohappoa/kg ka (K1S1, K1S2, K2S1 ja K2S2), jotta pH 4 saavutetaan. Ensimmäisen kasvuasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa painorehun maitohappopitoisuus jää 0,8 g maitohappoa/kg ka alle tämän. Ensimmäisen kasvuasteen lupiinivaltaisemmassa seoksessa tarvittava maitohappopitoisuus ylittyy 2 grammalla. Toisessa kasvuasteessa maitohapon pitoisuus ylittää selvästi tarpeen. Puskurikapasiteetin ja maitohappopitoisuuden lisäksi säilörehun happamuuteen vaikuttavat kuitenkin myös säilönnän aikana muodostuneet muut käymishapot ja pH:ta nostavat emäksiset aineet.

Painorehujen valkuaisen hajoavuus oli suurempaa kasvuasteella 1 kuin kasvuasteella 2. Ammoniumtypen osuuden lisääntyminen kertoo kasvisolujen proteolyyttisten entsyymien ja voihippoa tuottavien klostridien toiminnasta. Jos rehu ei sisällä voihippoa, ammoniumtypen osuuden lisääntyminen on seurausta kasvin omasta entsyymitoiminnasta. (McDonald ym. 1991). Suurin osa rehun ammoniakista ja amiineista on kuitenkin tavallisesti peräisin mikrobitoiminnasta (Rooke ja Hatfield 2003). Rehun valkuaisen hajoaminen ammoniumtypeksi vähenee pH:n laskiessa ja rehun tiiviiden lisääntyessä (Đorđević ym. 2011). Myös rehun kuiva-ainepitoisuus vaikuttaa proteolyysin määrään (McDonald ym. 1991). Kung ym. (2000) havaitsivat ammoniakilla säilötyn maissisäilörehun pH:n nousevan välittömästi ammoniakkin lisäämisen jälkeen. Ammoniikki

ei vaikuttanut maitohappobakteerien määrään, mutta se hidasti niiden kasvua painorehuun verrattuna. Todennäköisesti nyt tehdyssä tutkimuksessa raaka-aineen luonnollisten maitohappobakteerien määrä ei ollut riittävä rehun puskurikapasiteettiin nähden, jotta pH olisi laskenut nopeasti. Tämä mahdollisti valkuaisen hajoamisen ammoniakiksi. Ammoniakki nostaa rehun pH:ta ja lisää sen puskurikapasiteettia (Wilkinson ym. 2003), mikä ylläpiti entisestään pH:ta korkeana.

Kuiva-aine- ja sokeripitoisuuden ja puskurikapasiteetin perusteella kaikkien painorehujen huono laatu oli odotettavissa. Raaka-aineen pienin kuiva-ainepitoisuus, joka tarvitaan kompensoimaan substraatin (sokeri) riittämättömyyttä, lisääntyy, kun raaka-aineen sokeripitoisuuden ja puskurikapasiteetin suhde pienenee. Weissbachin (ym. 1974) esittämän yhtälön mukaan ensimmäisen kasvuasteen kuiva-ainepitoisuuden olisi tullut olla molemmissa seoksissa noin 430 g/kg ja toisen kasvuasteen molemmissa seoksissa noin 440 g/kg, jotta säilöntä ilman säilöntäainetta olisi tuottanut hyvälaatuista rehua. Biologisella säilöntäaineella säilöittäessä kuiva-ainepitoisuus voi olla 50 g/kg näitä pitoisuuksia pienempi ja kemiallisella säilöntäaineella säilöittäessä 100 g/kg pienempi (Weissbach ja Auerbach 2012). Raaka-aine oli kuitenkin tämän kokeen kaikissa rehuerissä näitäkin kuiva-ainepitoisuuksia märempää.

Biologinen säilöntäaine

Biologisella säilöntäaineella säilöttyjen rehujen pH oli kaikissa rehuerissä alle 4,20 ja säilöntälaatu oli ensimmäisessä kehitysasteessa kokonaisuudessaan hyvä. Toisessa kehitysasteessa biologinen säilöntäaine ei kuitenkaan pitänyt rehun laatua hyvänä. Rehujen voi happopitoisuus ja ammoniumtyypen osuus ylittivät tällöin hyvälaatuisen rehun rajan. Maitohappobakteerien suurempi määrä todennäköisesti ohjasi ensimmäisessä kehitysasteessa LAB-rehujen painorehua tehokkaammin maitohappokäymisen suuntaan. Tämä näkyy painorehua alempana pH:na, maitohapon suurempana osuutena ja vähäisempänä virhekehäymisenä.

Toisessa kehitysasteessa raaka-aineseosten märkyys ja pieni sokeripitoisuus saattoivat heikentää säilöntälaatua. Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen mukaan *Lactobacillus plantarum* DSM 3676 ja DSM 3677 eivät pystyneet laskemaan vaikeasti säilöittävän sinimaillassäilörehun (kuiva-ainepitoisuus 226 g/kg, sokeripitoisuus 16 g/kg) pH:ta, vähentämään kuiva-ainetappioita ja estämään valkuaisen hajoavuutta, kun

maitohappobakteerien annostustasot olivat 1×10^8 ja 5×10^8 pmy/g (EFSA 2012). Nämä annostusmäärät olivat selvästi suurempia, kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa. Nyt tehdyssä tutkimuksessa kasvuasteen 2 sokeripitoisuus oli myös selvästi pienempi kuin EFSA:n (2012) selvityksessä, ollen 12,26 ja 11,87 g/kg (S1 ja S2). Lisäksi lupiinivaltaisemman seoksen (S2) kuiva-ainepitoisuus (212 g/kg) oli pienempi kuin EFSA:n (2006) tutkimuksen sinimailasrehun kuiva-ainepitoisuus. Tämän perusteella nyt tehdyn tutkimuksen toisen kasvuasteen huono säilöntälaatu ei ole yllättävää. Sen sijaan kuiva-aine- ja/tai sokeripitoisuuden perusteella helposti ja keskivaikeasti säilöttävän rehumateriaalin säilöntään *Lactobacillus plantarum* DSM 3676 ja DSM 3677 soveltuivat hyvin (EFSA 2012).

Toisen kehitysasteen painorehut ja biologisella säilöntäaineella säilötyt rehut olivat hyvin samankaltaisia. Sen sijaan ensimmäisessä kehitysasteessa erot painorehujen ja LAB-rehujen välillä ovat selvästi suuremmat. Tulosten perusteella biologisella säilöntäaineella ei saatu hyvälaatuaista rehua toisessa kehitysasteessa, kun raaka-aineen sokeri- ja kuiva-ainepitoisuus oli pieni.

Muurahaishappo

Muurahaishapporehujen huono säilöntälaatu ja pH:n nousu säilönnän aikana oli yllättävää, sillä raaka-aineen pH laski nopeasti hapon lisäyksen jälkeen ja oli tällöin noin 3,6 kaikissa rehuerissä. Muurahaishappo rajoitti käymistä, jonka vuoksi rehun jäännössokerin pitoisuus oli korkea. Tätä havainnollistaa hyvin myös maitohapon osuus kaikista käymishapoista, joka oli suurimmillaan 40 % rehussa K1S2 ja muissa rehuerissä noin 15 %. Muurahaishappo ei kuitenkaan pystynyt estämään klostridien kasvua, mikä ilmeni kohonneena voihappopitoisuutena. pH:n nousun ja sen myötä käynnistyneen virheikäymisen syy ei ole täysin selvillä.

Kasvuasteen 1 muurahaishapporaaka-aineen pH:t olivat heti hapon lisäyksen jälkeen 3,57 ja 3,54 (seokset 1 ja 2). Kasvuasteella 2 pH:t olivat vain hieman tätä korkeammat. pH 4:n tulisi kuitenkin estää heterofermentatiivisten maitohappobakteerien, klostridien, *Bacillus*-suvun bakteerien ja gram-negatiivisten bakteerien kasvu täysin. Homofermentatiiviset maitohappobakteerit kestävät alhaisessa pH:ssa hieman edellä mainittuja lajeja suurempia muurahaishappomääriä. (Woolford 1975). *Lactobacillus plantarum*in kasvun optimi on pH 6:ssa ja kasvu hidastuu pH:n tästä noustessa tai laskiessa. Kasvu pysähtyy pH:n ollessa

noin 3,5 ja 8,75. (Giraud ym. 1991). Koska rehuissa esiintyi voi happoa alhaisesta alkupH:sta huolimatta, eivätkä klostridit itsessään voi kasvaa näin happamissa olosuhteissa, jonkin muun seikan täytyi käynnistää pH:n nousu rehussa, mikä sitten edelleen mahdollisti haittamikrobien aiheuttaman virheikäymisen.

pH 3:ssa voivat kasvaa enää vain hiivat ja homeet (Woolford 1975). Hiivoista ja homeista suurin osa voi kuitenkin toimia ainoastaan aerobisissa olosuhteissa, anaerobisissa olosuhteissa kasvavia hiivalajeja ovat *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces* ja *Torulopsis* (McDonald ym. 1991). Jos käymisolosuhteet eivät ole täysin hapettomat, hallitsevat edellä mainituista lajeista maitohappoa substraattinaan käyttävät *Candida* ja *Hansensula*. Jos täysin anaerobiset olosuhteet saavutetaan ja ne myös pysyvät yllä säilönnän ajan, näiden lajien osuus laskee noin 15 prosenttiin ja hiivalajeista hallitsevaksi muodostuu *Saccharomyces*, joka käyttää maitohapon sijaan substraattinaan sokeria. (Jonsson ja Pahlow 1984, ref. McDonald ym. 1991).

Osassa muurahaishapporehuista havaittiin hometta siilojen avaamisen yhteydessä, joissakin muurahaishapporehuissa oli myös leivän tuoksu, joka kertoo hiivojen kasvusta. Hiivojen toiminnan merkittävin käymistuote on etanoli (McDonald ym. 1991). Muurahaishapporehujen etanoli- ja muiden alkoholien pitoisuudet eivät kuitenkaan poikenneet muista rehuista ja kokonaisuudessaan etanolipitoisuudet olivat kasvuasteen 1 painorehujen lukuun ottamatta hyvälaatuisen rehun tasolla (< 15 g/kg ka) (Hoffmann 2012, ref. Richardt 2012). Etanolin lisäksi hiivat tuottavat anaerobisissa olosuhteissa etikka-, propioni-, voi-, isovoi- ja isovaleriaanahappoa sekä etyyliasettaattia, propanolia, isobutanolia ja isopentanolia (Kibe ym. 1977). Kasvuasteella 2 molemmat muurahaishapporehun seokset sisälsivät kaikkia edellä mainittuja karboksyylihappoja, ja rehussa K2S2 myös propanolia. Kasvuasteen 1 vehnävaltaisemmassa seoksessa esiintyi ainoastaan etikka- ja voi happoa ja lupiinivaltaisemmassa seoksessa etikka-, voi-, isovoi ja isovaleriaanahappoa. Homeiden kasvu säilörehussa ei ole toivottavaa, koska ne hajottavat sokeria, maitohappoa, selluloosaa ja muita soluseinämärakenteita. Lisäksi homeet voivat myös tuottaa mykotoksiineja. (Scudamore ja Livesey 1998).

Kasvuasteen 1 lupiinivaltaisempaa seosta lukuun ottamatta kaikki muut muurahaishapporehut sisälsivät enemmän etikkahappoa kuin maitohappoa. Näissä rehuerissä maitohapon ja etikkahapon suhde oli noin 0,5–0,8. Kaikissa muissa

säilöntäainekäsittelyissä (PR, NaHe, LAB) rehut sisälsivät aina enemmän maitohappoa kuin etikkahappoa. Jos käymisolosuhteet eivät ole täysin hapettomat, maitohappobakteerit tuottavat tavallisesti enemmän etikkahappoa kuin maitohappoa (Condon 1987). Siilojen avaamisen yhteydessä kuitenkin havaittiin, että osaan muurahaishapporehuista, ja myös muihin rehuihin, oli selvästi muodostunut alipainetta. Tämä ei olisi mahdollista, jos käymisolosuhteet olisivat hapekkaat. McEniry ym. (2007) havaitsivat hapellisten käymisolosuhteiden aiheuttavan homeiden kasvua rehuissa. Lisäksi rehujen pH kohosi, kuiva-aineen, maitohapon ja sokerin pitoisuudet ja rehun puskurikapasiteetti ja kuiva-aineen sulavuus pienenevät hapettomissa käymisolosuhteissa tuotettuun rehuun verrattuna. Voihapon, ammoniumtypen, NDF:n, ADF:n ja tuhkan pitoisuuksien ja maitohappobakteerien, enterobakteerien, klostridien, basillien ja hiivojen määrien puolestaan raportoitiin nousevan. Lisäksi hapettomat käymisolosuhteet pienensivät rehujen aerobista stabiilisuutta. Käymisolosuhteiden hapellisuus ei vaikuttanut säilörehun etanolin, etikkahapon ja propionihapon pitoisuuksiin. (McEniry ym. 2007). Tällaisia muutoksia ei havaittu nyt tehdyn kokeen rehuissa, minkä perusteella muurahaishappojen huono käymislaatu ei siis johtunut hapellisista käymisolosuhteista.

Muurahaishapporehujen pH saattoi nousta myös rehun puskurikapasiteetin vaikutuksesta. Rehun puskurikapasiteetti on seurausta pääasiassa rehun raaka-aineen sisältämien orgaanisten happojen pitoisuuksista (Rooke ja Hatfield 2003). Kasvin orgaaniset hapot sijaitsevat kasvisolujen solunesteessä tai ne voidaan erittää kantajaproteiinien avulla soluvälitilaan, josta ne kuljetetaan kohti nilaa ja juuria (López-Bucio ym. 2000). Muurahaishapon säilöntävaikutus perustuu nopeaan pH:n laskuun heti annostelun jälkeen, ja sitä seuraavaan kasvinesteiden vapautumiseen rehumassasta ja sen lisäksi hapon suoraan antimikrobiologiseen vaikutukseen (Winters ym. 1987). pH:n nopea lasku heti säilöntäaineen annostelun jälkeen oli seurausta muurahaishapon suorasta happamoittavasta vaikutuksesta. Muurahaishapon vapauttaessa rehumassan kasvinesteitä rehun sisältämät orgaaniset hapot pääsivät puskuroimaan muurahaishappoa, minkä seurauksena rehun pH alkoi kohota. Valkolupiinin varret olivat kovia ja puumaisia, mikä on havaittu myös Fraserin ym. (2005) tutkimuksessa. Tämä saattoi osaltaan hidastaa kasvinesteiden vapautumista valkolupiinista. Morrison (1988) havaitsi, ettei muurahaishappo vaikuttanut lainkaan sinimailasrehun ligniiniin. Lisäksi säilöntäainekäsittely hajotti sinimailasan hemiselluloosaa vähemmän kuin raiheinän, mikä voi johtua nurmiheinä- ja palkokasvien erilaisesta kuidun rakenteesta (Morrison 1988).

Kova ja puumainen kasvimateriaali saattoi siis olla paremmin suojassa muurahaishapon soluja rikkovalta vaikutukselta, jonka vuoksi valkolupuihin puskuroiva vaikutus ei näkynyt heti rehun pH:ssa.

Vaikka rehun pH:n nopea lasku säilönnän yhteydessä on suositeltavaa, se saattoi tässä kokeessa osaltaan vaikuttaa MH-rehujen huonoon säilönnälliseen laatuun. pH:n lasku, eli säilöntäaineen happovaikutus, ei itsessään ole tärkein eikä ainut voihappokäymisen ehkäisijä (Kaiser ym. 2002, 2005). Muurahaishapon antimikrobinen vaikutus perustuu ei-dissosioituneeseen happomolekyyliin. Muurahaishapon pKa-arvo on 3,75. pH-tasoilla 3,5, 3,75 ja 4,0 64 %, 50 % ja 36 % muurahaishapon molekyyleistä on dissosioitunut. (Lück ja Jager 1997). Tämä bakteriosidinen vaikutus ei kuitenkaan välttämättä ollut riittävä, kun rehun klostridipitoisuus oli suuri. Säilövä vaikutus perustui todennäköisesti enemmän happovaikutukseen, joka ei kuitenkaan ollut riittävä.

Jotta rehun säilöntälaadusta tulisi hyvä, rehussa tarvitaan alhaisen pH:n lisäksi suoraan klostridien aktiivisuuteen vaikuttava inhibiittori, joita voivat olla rehun vesiaktiivisuuden vähentäminen (eli esikuivatus) ja nitraattipitoisuus (Kaiser ym. 2005). Kaiser ym. (1999) havaitsivat helposti säilöttävien nurmisäilörehujenkin säilönnän epäonnistuvan, kun rehun raaka-aineen nitraattipitoisuus oli erittäin alhainen. Tämän tuloksena rehun voihappopitoisuus oli korkea, vaikka pH oli matala ja ammoniakin, etikkahapon ja alkoholien pitoisuudet olivat erittäin pienet. Mineraalityypilannoituksen lisääminen lisää myös rehujen nitraattipitoisuutta (Weiss ym. 2006). Mineraalityypilannoitus on vuosien saatossa vähentynyt, jonka seurauksena myös rehujen nitraattipitoisuus on pienentynyt. Tämän vuoksi vanhat tutkimustulokset, jotka on tehty nitraattipitoisuudeltaan korkeilla rehuilla, eivät välttämättä enää päde (Kaiser ym. 2002).

Gram-negatiiviset bakteerit, joita ovat esimerkiksi enterobakteerit, sietävät klostrideja ja maitohappobakteereja heikommin muurahaishapolla laskettua alhaista pH:ta (Woolford 1975). Säilönnän alkuvaiheessa toimivat enterobakteerit muuttavat osan kasvin nitraatista nitriitiksi, joka estää klostridien kasvua (Spoelstra 1983, McDonald ym. 1991). MH-rehujen nopea pH:n lasku säilönnän alussa todennäköisesti esti enterobakteerien toiminnan, jolloin nitriittiä ei päässyt muodostumaan. Tämän, raaka-aineen suuren klostridimäärän ja alhaisen kuiva-ainepitoisuuden vuoksi haittamikrobien kasvu ei estynyt alhaisesta pH:sta huolimatta. Polip (2001, ref. Kaiser ym. 2002) havaitsi tutkimuksissaan, että klostridit

kestäisivätkin happamia olosuhteita paremmin kuin aiemmat tutkimukset kriittisistä pH-arvoista antavat ymmärtää. Tämän vuoksi säilörehujen, joiden klostridien kasvua rajoittava nitraattipitoisuus on pieni, pH:n täytyy laskea paljon alemmaksi kuin vanhojen tutkimusten mukaan olisi tarve, jotta klostridien kasvu estyy (Kaiser ym. 2002).

Rammerin (1996) ja Rammerin ja Lingvallin (1997) tutkimuksissa muurahaishappo (annostustaso 3,9 l/t, 85 % happona ilmaistuna – vastaa 3,3 l/t 100% happona) ei kyennyt estämään klostridien kasvua nurmisäilörehussa, joka oli kontaminoitunut *Clostridium tyrobutyricum*-itiöistä. Rammerin (1996) tutkimuksessa rehun laatu oli voihappopitoisuutta lukuun ottamatta hyvä. Nyt tehdyn tutkimuksen koerehujen klostridi-itiömäärä oli suuri, mikä voitiin havaita myös suurien voihappopitoisuuksien perusteella. Rammerin (1996) ja Rammerin ja Lingvallin (1997) mukaan rehun sisältämien klostridi-itiöiden vaikutus rehun käymislaatuun riippuu jopa enemmän rehun säilöttävyydestä, eli kuiva-ainepitoisuudesta, puskurikapasiteetista ja sokeri- ja nitraattipitoisuudesta, kuin rehun sisältämien klostridi-itiöiden määrästä.

Todennäköisesti muurahaishapon annostustaso (4 l/t 100 % hapoksi muunnettuna) ei ollut riittävä valkolupiinin puskurikapasiteettiin ja rehun märkyyteen ja klostridimääriin nähden. Beck (1968, ref. McDonald ym. 1991) havaitsi muurahaishapon estävän selvästi klostridien ja enterobakteerien kasvua, mutta vaikutus riippui suuresti käytetystä happokonsentraatiosta. Hyvin pienillä annostustasoilla muurahaishappo jopa edisti haittamikrobien kasvua. Chamberlainin ja Quigin (1987) tutkimuksessa muurahaishapon annostustasot 2 ja 6 l/t tuottivat hyvälaatuista nurmisäilörehua. Sen sijaan annostustasolla 4 l/t rehun säilöntälaatu oli huono. Alimmassa happoannostustasossa rehun luonnollinen maitohappokäyminen tuki säilönnässä muurahaishappoa ja korkein happoannostustaso esti käymisen täysin, minkä vuoksi rehujen säilöntälaatu oli hyvä. Keskimmaisella tasolla muurahaishappo häiritsi maitohappobakteerien toimintaa enemmän kuin enterobakteerien, jonka seurauksena säilöntälaatu oli huono.

Rondahl ym. (2006) suosittelevat herne-kauran säilönnässä happoannostustasoa 6 l/t, hapon konsentraatiota ei mainittu. Pursiaisen ja Tuorin (2008) tutkimuksessa happoannostustaso 4 l/t (85 %) havaittiin sopivaksi säilöttäessä vehnää kokoviljasäilörehuna herneen, härkäpavun ja rehuvirnan kanssa, kun palkoviljakasvin osuus vaihteli 0–75 %. Tällöin säilöntä tuotti hyvälaatuista säilörehua, kun raaka-aineen

klostridi-itiöiden määrä oli hyvin alhainen. Annostustaso 4 l/t 85 % happoa vastaa 3,4 l/t 100 % hapoksi muunnettuna. Pursiaisen ja Tuorin (2008) tutkimuksen palkoviljojen puskurikapasiteetit ja seosten kuiva-ainepitoisuudet vastasivat nyt tehdyn tutkimuksen raaka-aineen pitoisuuksia. Doležalin ym. (2008) tutkimuksessa happoannostaso 6 l/t havaittiin pienempää annostaso (3 l/t) paremmaksi puhtaan keltalupiinisäilörehun säilönnässä. Happoannostusten konsentraatioita ei ollut mainittu tutkimuksessa.

Natriumnitriitin ja heksamiinin seos

Natriumnitriitin ja heksamiinin seos osoittautui tässä tutkimuksessa parhaaksi säilöntäaineeksi, sillä se tuotti hyvälaatuista säilörehua kaikissa kasvuasteissa ja seoksissa. Vehnävaltaisemmissa seoksissa ei esiintynyt lainkaan voihippaa kummassakaan kasvuasteessa. Lupiinivaltaisemmissa seoksissa voihippaa esiintyi niin pieninä pitoisuuksina, ettei se ollut riski rehun hyvälle laadulle. Myös ammoniumtypen osuus kokonaistypestä oli NaHe-rehuissa hyvä, kun oletettiin, että säilöntäaineessa lisätyt typpiyhdisteet hajoavat kokonaan ammoniakiksi, joka ei haihdu pois rehusta. Käytetyillä koemenetelmillä ei kuitenkaan voida saada selvyyttä siihen, mikä osuus rehun ammoniumtypestä oli peräisin säilöntäaineesta ja mikä proteolyysistä. Aiempaa tutkimustietoa tästä ei myöskään ollut saatavilla. Myös Lingvall ja Lättemäe (1999) havaitsivat natriumnitriitin ja heksamiinin seoksen nostavan säilörehun ammoniumtypen osuuden yli hyvälaatuisen rehun rajan. Kuitenkin ammoniumtypen korjauksen jälkeen pitoisuudet olivat hyvälaatuisen rehun tasolla (< 80 g/kg kok. N). Myös Lingvall ja Lättemäe (1999) oletivat, että kaikki säilöntäaineen kautta lisätty ammoniakki oli jäänyt rehuun, eikä ollut haihtunut siitä pois.

Voihippopitoisuuden perusteella natriumnitriitin ja heksamiinin seos esti klostridien toiminnan, vaikka pH jäi suomalaisten laatuksien mukaan (MMM 1999) korkeaksi. Myös Hellberg (1967) havaitsi natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella säilötyn rehun pH:n jäävän korkeammaksi kuin muilla säilöntäaineilla säilöttyjen rehujen, vaikka muutoin rehun laatu oli hyvä tai erittäin hyvä. Rehuissa, joiden säilöntä perustuu alhaisen pH:n sijaan suoraan haittamikrobeihin vaikuttaviin aineisiin, pH ei ole sopiva laatuksien ja saa ylittää 4,20:n (MMM 1999). Myös aiemmissa tutkimuksissa natriumnitriitin ja heksamiinin seoksen on todettu vähentävän selvästi säilörehun klostridi-itiöiden määrää (Lättemäe 1997) ja voihippopitoisuutta (Hellberg 1967, Lättemäe 1997, Plöchl ym. 2009). Toisaalta natriumnitriitin ja heksamiinin seos lisäsi rehun klostridimäärää Pieperin ym. (2012)

tutkimuksessa verrattuna muihin säilöntäaineisiin ja ilman säilöntäainetta tehtyyn säilöntään. Natriumnitriitin ja heksamiinin seos kuitenkin vähensi voihapsen muodostusta painorehuun verrattuna, mutta ei ollut siinä yhtä tehokas kuin osittain neutralisoitu muurahaishappo, biologisen säilöntäaineen ja osittain neutralisoidun muurahaishapon yhdistelmä tai biologisen säilöntäaineen ja melassin yhdistelmä (Pieper ja Korn 2009). Natriumbentsoaatin ja natriumpropionaatin käytön yhdessä natriumnitriitin ja heksamiinin kanssa on raportoitu olevan vielä natriumnitriittiä ja heksamiiniakin tehokkaampi klostridien toiminnan ehkäisijä (Lättemäe ja Lingvall 1999). Myös Knický ja Lingvall (2004) ja Knický ja Spörndly (2009) havaitsivat tämän yhdistelmän erittäin tehokkaaksi klostridien ja hiivojen kasvun ehkäisijänä ja aerobisen stabiilisuuden parantajana.

NaHe-rehuista mitatut korkeat pH:t ja osassa NaHe-rehuista myös pienet maitohappopitoisuudet saattavat johtua heksamiinin haitallisesta vaikutuksesta maitohappobakteereihin. Maitohappobakteereita rajoittava vaikutus ei kuitenkaan ollut yhtä voimakas kuin muurahaishapolla säilöittäessä. Lisäksi maitohapon osuus kaikista käymishapoista oli yli 60 % kaikissa NaHe-rehuissa. Lättemäe (1997) havaitsi korkeiden heksamiinimäärien rajoittavan maitohappobakteerien aktiivisuutta. Myös Hellberg (1967) havaitsi natriumnitriitin ja heksamiinin seoksen alentavan rehun maito- ja etikkahappopitoisuutta. Vaikutus oli Lättemäen (1997) tutkimuksissa sitä suurempi, mitä isompia heksamiiniannostuksia käytettiin rehun säilönnässä. Tämän seurauksena heksamiinilla säilötyn rehun maitohappomäärät olivat pieniä ja pH korkea. Tällöin myös maitohappobakteereiden kanssa kilpailevien mikro-organismien (homeet ja klostridit) määrä lisääntyi.

Nyt tehdyssä kokeessa käytettiin 500 g/t heksamiinia ja 750 g/t natriumnitriittiä. Lättemäen (1997) mukaan tehokkain heksamiini- ja natriumnitriittitaso on 300 g heksamiinia ja 450 g natriumnitriittiä /t tuoretta rehua. Kung ym. (2003) puolestaan suosittelivat heksamiinia 600 g/t ja natriumnitriittiä 900 g/t ja Gross ja Beck (1972, ref. Lättemäe 1997) heksamiinia 400 g/t ja natriumnitriittiä 800 g/t. Weissbachin ja Auerbachin (2012) mukaan tarvittavan heksamiinin ja natriumnitriitin annostaso riippuu rehun kuiva-ainepitoisuudesta. Kun raaka-aineen kuiva-ainepitoisuus on 180 g/kg, natriumnitriitin ja heksamiinin seosta tarvitaan keskimäärin 3,0 l/t ja kuiva-ainepitoisuudessa 400 g/kg tarvittava annostustaso on enää 1,0 l/t. He eivät kuitenkaan mainitse mikä on heksamiinin ja natriumnitriitin konsentraatio näissä annostustasoissa.

NaHe-rehujen maitohapon osuus kaikista käymishapoista lisääntyi kasvuston vanhetessa ja seoksen lupiinipitoisuuden lisääntyessä ja oli suurin kasvuasteen 2 lupiinivaltaisemmassa seoksessa. Myös maitohapon pitoisuudessa havaittiin samantapainen trendi. Maitohappopitoisuus oli sitä suurempi, mitä märempää rehuerän raaka-aine on. Todennäköisesti rehun kuiva-ainepitoisuus vaikutti siihen, miten tehokkaasti natriumnitriitin ja heksamiinin seos toimi, kuten Weissbach ja Auerbach (2012) totesivat. Sama ilmiö voidaan havaita myös NaHe-rehujen voi- ja kapronihappopitoisuudessa. Vehnävaltaisemmissa, kuivemmissa seoksissa voi- ja kapronihappoa ei esiinny lainkaan, sen sijaan lupiinivaltaisemmissa, märemmissä seoksissa niitä esiintyy hyvin pieninä määrinä. Myös etanolin määrä oli korkeampi lupiinivaltaisemmissa seoksissa. Tämän perusteella myös natriumnitriitillä ja heksamiinilla säilötty rehu olisi etenkin lupiinivaltaisempien seosten kohdalla hyötynyt jonkin verran esikuivauksesta tai hieman suuremmasta säilöntäaineen annostelusta. Kuitenkin jo nykyisillä kuiva-ainepitoisuuksilla ja säilöntäaineen annostustasoilla NaHe-rehujen säilöntälaatu oli hyvä kaikissa rehuerissä.

6.4 Tuorepaino- ja kuiva-ainetappiot

Rehun säilönnän aikana syntyvät tappiot voivat olla seurausta rehun normaalista maitohappokäymisestä, mutta sitä aiheuttavat myös puristenesteen muodostuminen, virheikäminen ja ilman vuotaminen siiloon säilönnän aikana (McDonald ym. 1991). Nyt tehdyssä tutkimuksessa maitohappokäyminen ja virheikäminen olivat käymistappioiden aiheuttajia. Rehujen käymislaadun perusteella käyminen oli anaerobista ja puristenestetappioita ei päässyt syntymään umpinaisissa lasisiiloissa.

Käymisen aiheuttamat tappiot ovat pienimmät homofermentatiivisten maitohappobakteerien puhtaassa maitohappokäymisessä, jossa substraattina toimii glukoosi tai fruktoosi ja käymisen lopputuotteina syntyy maitohapon lisäksi vettä ja ATP:ta. Tällöin kuiva-ainetappioita ei muodostu ja energiatappiot ovat vain 0,7 %. Homo- ja heterofermentatiivisten maitohappobakteerien sekakäymisen käymistuotteita ovat maitohapon lisäksi esimerkiksi etikkahappo, hiilidioksidi, etanoli ja vesi. Sekakäymisen kuiva-aine- ja energiatappiot ovat puhdasta maitohappokäymistä suuremmat, ollen 4,8–32,8 ja 1–2,2 %. Klostridien, enterobakteerien ja hiivojen aiheuttassa virheikämisessä

tappiot ovat kaikkien suurimmat. Tällöin kuiva-ainetappiot voivat olla 40–51 % ja energiatappiot jopa 18 %. (McDonald ym. 1991).

Nyt tehdyssä tutkimuksessa ei havaittu säilöntäaineiden ja tuorepaino- ja kuiva-ainetappioiden välillä mitään selkeää linjaa. Myöskään tuorepaino- ja kuiva-ainetappiot eivät olleet linjassa toisiinsa. Esimerkiksi lupiinivaltaisimmissa LAB-rehuissa tuorepainotappiot olivat kaikkein suurimmat, kun taas näiden rehujen kuiva-ainetappiot eivät poikenneet muista säilöntäainekäsittelyistä. Kuiva-ainetappiot olivat etenkin toisessa kasvuasteessa suurimmaksi osaksi negatiivisia. Myös ensimmäisessä kasvuasteessa saatiin muutamien yksittäisten siilojen osalta negatiivisia kuiva-ainetappioita. Tämä saattaa johtua raaka-aineen ja säilörehujen kuiva-ainemäärityksen ja säilörehun kuiva-ainekorjauksen epätarkkuudesta näin pienen mittakaavan siiloissa. Käymistappioiden mittaustulokset eivät sen vuoksi olleet luotettavia ja tuloksia voidaan tarkastella ainoastaan vertailemalla säilöntäainekäsittelyitä kunkin rehuerän sisällä.

Ensimmäisessä kasvuasteen molemmissa seoksissa kuiva-ainetappiot olivat suuremmat painorehuissa kuin muissa käsittelyissä (MH, NaHe, LAB). Tämä selittyy painorehujen voimakkaammalla käymisellä ja virhekäymisen suurella osuudella muihin käsittelyihin verrattuna. Ensimmäisen kasvuasteen muurahaishapporehujen painorehua pienemmät kuiva-aine- ja tuorepainotappiot johtuvat käymisestä, joka oli huomattavasti rajoitetumpaa kuin painorehuissa. Myös voihaapon pitoisuudet olivat pienemmät kuin painorehuissa. Natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella säilöttyjen rehujen kuiva-ainetappiot olivat ensimmäisen kasvuasteen vehnävaltaisemmassa seoksessa hieman suuremmat kuin muurahaishapporehun. Tämä voi johtua NaHe-rehujen voimakkaammasta käymisestä. Lupiinivaltaisemmassa seoksessa MH-rehujen kuiva-ainetappiot olivat suuremmat kuin NaHe-rehujen. Tällöin käyminen oli lähes yhtä voimakasta molemmissa käsittelyissä, mutta NaHe-rehujen voihaappopitoisuus oli huomattavasti pienempi kuin MH-rehujen. Ensimmäisen kasvuasteen LAB-rehujen kuiva-ainetappiot olivat vehnävaltaisemmassa seoksessa NaHe-rehun tasolla ja lupiinivaltaisemmassa seoksessa MH-rehun tasolla. Käyminen oli LAB-rehuissa voimakkaampaa kuin MH- ja NaHe-rehuissa, mutta kuiva-ainetappiot pysyivät maltillisina koska käyminen oli hyvin puhdasta maitohappokäymistä.

Toisessa kasvuasteessa molempien seosten painorehujen kuiva-ainetappiot olivat pienet ja seosten välinen ero oli pieni. Sen sijaan muissa käsittelyissä seosten välillä havaittiin

selvempi ero, etenkin LAB- ja NaHe-rehuissa. Toisessa kasvuasteessa suurimmat kuiva-ainetappiot havaittiin vehnävaltaisemmassa LAB-rehussa. Säilörehujen käymislaatu kuitenkin kuvastaa huonosti mitattuja kuiva-ainetappioita. Painorehussa, jonka kuiva-ainetappiot olivat vehnävaltaisemmassa seoksessa kaikkein pienimmät, käymishappojen kokonaismäärä ja etanolipitoisuus oli suurempi kuin muissa vehnävaltaisemman seoksen rehuissa. Erityisen silmiinpistävää on biologisella säilöntäaineella säilötyn rehun (LAB) ja painorehun välinen suuri ero kuiva-ainetappioissa, vaikka säilöntälaadun perusteella tällaista eroa ei ollut havaittavissa.

Aiemmissa tutkimuksissa natriumnitriitin ja heksamiinin seos on vähentänyt rehun säilöntätappioita painorehuun ja homofermentatiivisilla (Plöchl ym. 2009, Herrmann ym. 2011) ja homo- ja heterofermentatiivisilla (Herrmann ym. 2011) maitohappobakteereilla säilöttyyn rehuun verrattuna. Pieperin ja Kornin (2009) tutkimuksessa kaikki käytetyt säilöntäaineet vähensivät kuiva-ainetappioita painorehuun verrattuna. Säilöntäaineista tehottomin oli homofermentatiivinen biologinen säilöntäaine, joka pienensi tappioita 17 % painorehuun verrattuna. Tehokkain kuiva-ainetappioiden ehkäisijä oli puolestaan homofermentatiivisen biologisen säilöntäaineen ja muurahaishapon ja natriumformaatin yhdistelmä, joka pienensi tappioita 63 % painorehuun verrattuna. Natriumnitriitin ja heksamiinin seos pienensi tappioita 32 % painorehuun verrattuna. Fraserin ym. (2005) valkolupiinin säilöntäkokeessa *Lactobacillus plantarum* lisäsi kuiva-ainetappioita painorehuun verrattuna. Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen mukaan *Lactobacillus plantarum* DSM 3676 ja DSM 3677 eivät vaikuttaneet vaikeasti säilöttävän sinimaillassäilörehun kuiva-ainetappioihin, kun kontrollina oli painorehu. Sen sijaan kuiva-aine- ja/tai sokeripitoisuuden perusteella helposti ja keskivaikeasti säilöttävän rehumateriaalin kuiva-ainetappioita *Lactobacillus plantarum* pienensi jonkin verran. (EFSA 2012).

6.5 Aerobinen stabiilisuus

Säilörehuista suurin osa oli aerobisesti täysin stabiileja 13 päivän mittausjakson aikana. Jälkilämpenemistä tapahtui vain muutamissa siiloissa. Nämä lämmenneet siilot olivat kuitenkin erittäin epästabiileja, sillä rehut lämpenivät keskimäärin jo noin kahden vuorokauden kuluessa aerobisille olosuhteille altistumisesta. Wilkinson ja Davies (2012) asettavat aerobisen stabiilisuuden hyväksi tavoitteeksi 168h (7 päivää), jonka aikana

rehun lämpötilassa ei tulisi tapahtua muutoksia eikä rehuun saisi muodostua näkyvää hometta.

Wilkinson ja Davies (2012) mainitsevat kasvuston rehunkorjuun aikaisen epifyyttisen hiiva- ja homepopulaation olevan tärkein aerobiseen stabiilisuuteen vaikuttava tekijä. Hiivojen ja homeiden määrä tulisi rehun raaka-aineessa olla alle 10^5 pmy/g tuoretta rehua. (Wilkinson ja Davies 2012). Aerobinen stabiilisuus riippuu pH:sta ja etikkahappopitoisuudesta. Mitä korkeampi pH, sitä enemmän rehun täytyy sisältää etikkahappoa, jotta jälkilämpeneminen estyy. Kun rehun etikkahappopitoisuus on alle 3 g/kg, rehu on tavallisesti aerobisesti epästabiili. (Weissbach ja Auerbach 2012). Davies ym. (2002) puolestaan havaitsivat rehun ammoniumtypen osuuden, kuiva-aine-, maitohappohappopitoisuuden lisääntymisen parantavan rehun aerobista stabiilisuutta. Tutkimuksessa käytettyjen rehujen kuiva-ainepitoisuus oli kuitenkin melko suuri ja vaihteluväli oli pieni (340–390 g/kg), joten tulokset eivät välttämättä ole yleistettävissä märempiin rehuihin.

Rehun pH ja etikkahappopitoisuus ei selittänyt kovin hyvin lämpenemistä. Yli 3 g/kg etikkahappopitoisuuksia mitattiin ainoastaan ensimmäisen kasvuasteen vehnävaltaisemman seoksen NaHe-rehuista ja toisen kasvuasteen lupiinivaltaisemman seoksen LAB-rehuista. Yksi lämmenteistä siiloista oli kuitenkin nimenomaan K2S2-LAB-rehua. Kun lämmenteitä siiloja verrattiin rinnakkaisiin, lämpenemättömiin siiloihin, rehuerien välillä ei havaittu mitään systemaattista syytä lämpenemiselle. Lämmenteiden ja lämpenemättömien rinnakkaisten siilojen välillä ei havaittu pH:ssa eikä kuiva-aineen ja käymishappojen pitoisuuksissa mitään selkeää yhteyttä lämpenemiseen. Esimerkiksi lämmenteen K2S2-LAB-siilon etikka- ja kapronihappopitoisuus oli noin kaksinkertainen lämpenemättömiin rinnakkaisiin siiloihin verrattuna, eikä siilojen pH:ssa havaittu suuria eroja.

Biologisella säilöntäaineella säilöttyjen rehujen aerobinen epästabiilisuus oli odotettavissa. Aiemmissa tutkimuksissa *Lactobacillus plantarum* DSM 3676 ja DSM 3677 eivät ole parantaneet rehun aerobista stabiilisuutta painorehuun verrattuna (EFSA 2012). Fraserin ym. (2005) tutkimuksessa *Lactobacillus plantarum* heikensi hieman valkolupiinisäilörehun aerobista stabiilisuutta painorehuun verrattuna. Valkolupiinisäilörehujen aerobinen stabiilisuus ei kuitenkaan ollut kovin hyvä, sillä kaikki rehut lämpenivät keskimäärin noin 36h kuluessa ilmalle altistumisesta. (Fraser ym. 2005). Palkokasvilaji ja

kokoviljasäilörehun palkokasvin määrä vaikuttavat säilörehun aerobiseen stabiilisuuteen (Pursiainen ja Tuori 2008). Weinbergin ja Muckin (1996) mukaan kokoviljasäilörehujen aerobinen stabiilisuus on tyypillisesti huonompi kuin palkokasvisäilörehujen. Palkokasvien hyvä aerobinen stabiilisuus voi johtua kasvin sisältämistä aineista (esim. saponiinit), jotka ehkäisevät homeiden ja hiivojen kasvua (Weinberg ja Muck 1996, Adesogan ja Salawu 2004).

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Raaka-aineen koostumuksen ja *in vitro* -sulavuuden perusteella valkolupiini-vehnäkokoviljasäilörehu ei soveltune ainoana karkearehuna lypsylehmien ruokintaan, vaan sitä tullee täydentää hyvin sulavalla nurmisäilörehulla. Ummessa olevien lypsylehmien, nuorkarjan ja lihanautojen ruokintaan se sen sijaan voisi soveltua myös ilman nurmisäilörehutäydennystä.

Tämän tutkimuksen perusteella valkolupiini-vehnäkokoviljasäilörehun säilöntä on haastavaa. Tämä johtui todennäköisesti raaka-aineen suuresta klostridi-itiömäärästä, jonka lisäksi myös rehun märkyys, pieni sokeripitoisuus ja valkolupiinin korkea puskurikapasiteetti vaikeuttivat säilöntää. Kehitysvaiheen ja kasvilajien seossuhteen havaittiin vaikuttavan rehun laatuun. Raaka-aineen koostumuksen perusteella rehu kannattaa tehdä lupiinivaltaisemmasta seoksesta ja korjata aikaisemmassa vaiheessa, jos halutaan maksimoida valkolupiini-vehnäkokoviljasäilörehun valkuais- ja sokeripitoisuus. Säilöntä on tällöin kuitenkin raaka-aineen kuiva-ainepitoisuuden ja puskurikapasiteetin perusteella vaikeampaa ja sato jää pienemmäksi kuin myöhemmässä vaiheessa korjattuna. Säilöntätulos olisi voinut olla tämän kokeen toisessa kasvuasteessa parempi, jos rehu olisi korjattu hyvissä sääolosuhteissa. *In vitro* -määrityksen perusteella korjuuajalla tai seossuhteella ei näyttäisi olevan suurta merkitystä rehun sulavuuden ja energia-arvon kannalta.

Tutkimuksen perusteella säilönnässä tulee aina käyttää säilöntäainetta. Tässä kokeessa natriumnitriitin ja heksamiinin seos tuotti säilöntälaadultaan parhaat rehut riippumatta seoksesta tai kasvuasteesta, vaikka näiden rehujen pH:t jäivät joissain erissä korkeiksi. Koska natriumnitriitin ja heksamiinin seoksen toiminta perustuu suoraan haittamikrobien toiminnan ehkäisyyn, tämän tutkimuksen perusteella pH ei ole sopiva laatukriteeri arvioitaessa natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella käsiteltyjen rehujen laatua. Biologinen säilöntäaine toimi hyvin vain ensimmäisessä kehitysasteessa, kun raaka-aineessa oli enemmän sokeria ja kuiva-ainepitoisuus oli suurempi kuin myöhemmässä kehitysasteessa. Muurahaishapolla säilöttyjen rehujen laatu oli huonompi kuin natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella säilöttyjen rehujen. Todennäköisesti muurahaishapon annostustaso ei ollut tässä kokeessa riittävä valkolupiinin märkyyteen, puskurikapasiteettiin ja klostridi-itiömäärään nähden. Tämä mahdollisti pH:n nousun ja

rehun voihappokäymisen. Tarvitaankin vielä lisää tutkimusta muurahaishapon sopivasta annostustasosta ja esikuivauksen vaikutuksesta valkolupiinin säilöntään. Tulosten tarkastelun kannalta olisi ollut edullista, jos raaka-aineesta olisi määritetty myös homeiden, hiivojen ja enterobakteerien määrät sekä nitraattipitoisuus ja säilörehuista mikrobiologinen laatu.

LÄHTEET

- Adesogan, A. T. & Salawu, M. B. 2004. Effect of applying formic acid, heterolactic bacteria or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation of bi-crops of peas and wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(9): 983-992.
- Adesogan, A. T., Salawu, M. B., Williams, S. P., Fisher, W. J. & Dewhurst, R. J. 2004. Reducing concentrate supplementation in dairy cow diets while maintaining milk production with pea-wheat intercrops. *Journal of Dairy Science* 87(10): 3398-3406.
- Aniszewski, T. 1985. Lupiini viljelykasvina. Tiedote 21/85. Maatalouden tutkimuskeskus. Jokioinen, Suomi. 133 s.
- Aniszewski, T., Ciesiolka, D. & Gulewicz, K. 2001. Equilibrium between basic nitrogen compounds in lupin seeds with differentiated alkaloid content. *Phytochemistry* 57(1): 43-50.
- AOAC 1995. Official methods of analysis, 16th edition. Association of official analytical chemists, Arlington, VA, USA.
- Artturi 2014. Rehuanalyysin tulkinta / märehtijät. https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/Rehuanalyysi/Rehuanalyysin_tulkinta_marehtijat/Kemiallinen_koostumus. Tulostettu 14.3.2014.
- Auerbach, H., Nadeau, E. & Weiss, K. 2012. Benefits of using silage additives. Teoksessa: Auerbach, H., Lückstädt, C. & Weissbach, F. (toim.). *The Future of Silage Preservation. Proceedings of 1st International Silage Summit. Leipzig, November 12th, 2012.* s. 75-144.
- Australia New Zealand Food Authority 2001. Lupin alkaloids in food. A Toxicological review and risk assessment. Technical Report Series No. 3. 21 s.
- Azo, W. M., Lane, G. P. F., Cannon, N. C. & Davies, W. P. 2006. Dry matter yields and quality of organic lupin and lupin/cereal mixtures for wholecrop forage. *Aspects of Applied Biology* 79: 93-96.
- Azo, W. M., Lane, G. P. F., Davies, W. P. & Cannon, N. D. 2012. Bi-cropping white lupins (*Lupinus albus* L.) with cereals for wholecrop forage in organic farming: The effect of seed rate and harvest dates on crop yield and quality. *Biological Agriculture & Horticulture* 28(2): 86-100.

Beck, T. 1968. Die Mikrobiologische Prüfung von Silierhilfsmitteln im Wachstumsversuch. Das wirtschaftseigene Futter. Erzeugung - Konservierung - Verwertung. 14: 177 - 193.

Ben-Ghedalia, B. & Rubinstein, A. 1985. The effect of dietary starch on the digestion by sheep of cell wall monosaccharide residues in maize silage. Journal of the science of food and agriculture 36: 129-134.

Bergen, W. G., Byrem, T. M. & Grant, A. L. 1991. Ensiling characteristics of whole-crop small grains harvested at milk and dough stages. Journal of Animal Science 69(4): 1766-1774.

Blažević, N., Kolbah, D., Belin, B., Šunjić, V. & Kajfež, F. 1979. Hexamethylenetetramine, a versatile reagent in organic synthesis. Synthesis 3: 161-176.

Borreani, G., Chion, A. R., Colombini, S., Odoardi, M., Paoletti, R. & Tabacco, E. 2009. Fermentative profiles of field pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and white lupin (*Lupinus albus*) silages as affected by wilting and inoculation. Animal Feed Science and Technology 151: 316-323.

Boström, U. 2008. Intercropping narrow-leaved lupins with cereals for whole crop harvest. Teoksessa: Palta, J. A. & Berger, J. B. (toim.). Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. s. 38-41

Bruno-Soares, A. M., Falcão e Cunha, L., Merry, R., Davies, D. 2005a. Effects of additive application on the fermentation characteristics and protein degradation of *Lupinus albus* silage. Teoksessa: van Santen, E. & Hill, G. D. (toim.). México, where old and new world lupins meet. Proceedings of the 11th International Lupin Conference, Guadalajara, Jalisco, Mexico, 4-9 May 2005. s. 206-208.

Bruno-Soares, A. M., Falcão e Cunha, L., Merry, R. & Davies, D. 2005b. Effect of condensed tannin on the protein fraction of white lupin silage. Teoksessa: van Santen, E. & Hill, G. D. (toim.). México, where old and new world lupins meet. Proceedings of the 11th International Lupin Conference, Guadalajara, Jalisco, Mexico, 4-9 May 2005. s. 214-216.

- Bruno-Soares, A. M. & Vaz, M. M. 2000. Nutritive value of white and blue lupin forages at different stages of plant growth and the relationship to alkaloid and saponin contents. Teoksessa: van Santen, E., Wink, M., Weissmann, S. & Römer, P. (toim.). Lupin, an ancient crop for the new millennium: Proceedings of the 9th International Lupin Conference, Klink/Muritz, Germany, 20-24 June, 2000. s. 411-413.
- Buxton, D. R. & O'Kiely, P. 2003. Preharvest plant factors affecting ensiling. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.). Silage Science and Technology. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. s. 199-250.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Manzanilla, E. G., Badiola, I., Martín, M. & Gasa, J. 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 144: 165-170.
- Cavallarin, L., Tabacco, E. & Borreani, G. 2007. Forage and grain legume silages as a valuable source of proteins for dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* 6(1s): 282-284.
- Chamberlain, D. G. & Quig, J. 1987. The effects of the rate of addition of formic acid and sulphuric acid on the ensilage of perennial ryegrass in laboratory silos. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38(3): 217-228.
- Clark, W.M. 1920. The determination of hydrogen ions. Baltimore, USA: Williams & Wilkins Company. 317 s.
- Coblentz, W. K. & Muck, R. E. 2012. Effects of natural and simulated rainfall on indicators of ensilability and nutritive value for wilting alfalfa forages sampled before preservation as silage. *Journal of Dairy Science* 95(11):6635-6653.
- Condon, S. 1987. Responses of lactic-acid bacteria to oxygen. *FEMS microbiology reviews* 46(3): 269-280.
- Davies, D. R., Dhanoa, M. S., Leemans, D. K. & Merry, R. J. 2002. Relationships between chemical indicators of silage quality and laboratory-measured aerobic spoilage. Teoksessa: Jones, D. I. H., Jones, R., Dewhurst, R., Merry, R. & Haigh, P. (toim.). The XIIIth International silage conference, Sept. 11-13, SAC, Auchincruive Scotland. s. 188-189.

- Dawson, L. E. R. 2012. The effect of inclusion of lupins/triticale whole crop silage in the diet of winter finishing beef cattle on their performance and meat quality at two levels of concentrates. *Animal Feed Science and Technology* 171: 75-84.
- Deaville, E. R. & Givens, D. I. 2002. Chemical composition, digestibility and predicted energy value of whole-crop forage lupins. *Proceedings of the British Society of Animal Science Winter Meeting*. Scarborough 2002. s. 171.
- Doležal, P., Zeman, L. & Skládanka, J. 2008. Effect of supplementation of chemical preservative on fermentation process of lupine silage. *Slovakian Journal of Animal Science* 41(1): 30-38.
- Đorđević, N. Z., Grubić, G. A., Stojanović, B. D. & Božičković, A. D. 2011. The influence of compression level and inoculation on biochemical changes in lucerne silages. *Journal of Agricultural Sciences* 56(1): 15-23.
- Dracup, M. & Kirby, E. J. M. 1996. *Lupin development guide*. University of Western Australia Press. 97 s.
- EFSA 2006. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed for the establishment of guidelines on the assessment of safety and efficacy of silage additives, on a request from the commission under article 7(5) of regulation (EC) No 1831/2003. *EFSA Journal* 4(4): 349.
- EFSA 2012. Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Lactobacillus plantarum* (DSM 3676 and DSM 3677) and *Lactobacillus buchneri* (DSM 13573) as a silage additive for pigs, poultry, bovines, sheep, goats, rabbits and horses. *EFSA Journal* 10(7): 2780.
- Erbaş, M., Certel, M. & Uslu, M. K. 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chemistry* 89: 341-345.
- Faluyi, M. A., Zhang, F., Leibovitch, S. & Smith, D. L. 1997. White lupin growth, yield, and yield components in Eastern Canada: influence of management factors. *Agronomy Journal* 89: 781-788.
- Filya, I., Ashbell, G., Hen, Y. & Weinberg, Z. G. 2000. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Animal Feed Science and Technology* 88: 39-46.

- Fraser, M. D., Fychan, R. & Jones, R. 2005. The effect of harvest date and inoculation on the yield and fermentation characteristics of two varieties of white lupin (*Lupinus albus*) when ensiled as a whole-crop. *Animal Feed Science and Technology* 119: 307-322.
- Friedel, K. 1990. Die schätzung des energetischen futterwertes von grobfutter mit hilfe einer cellulase-methode. *Wissenschaftliche Zeitung Universität Rostock, N-Reihe* 39: 78-86.
- Fychan, R., Jones, R. & Fraser, M. 2002. Evaluation of two narrow-leafed lupin cultivars for silage and grain production. Teoksessa: van Santen, E. & Hill, G. D. (toim.). *Wild and Cultivated Lupins from the Tropics to the Poles. Proceedings of the 10th International Lupin Conference, Laugarvatn, Iceland, 19-24 June 2002. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.* s. 145-147.
- Gefrom, A., Ott, E. M., Hoedtke, S. & Zeyner, A. 2013. Effect of ensiling moist field bean (*Vicia faba*), pea (*Pisum sativum*) and lupine (*Lupinus* spp.) grains on the contents of alkaloids, oligosaccharides and tannins. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97(6): 1152-1160.
- Giraud, E., Lelong, B. & Raimbault, M. 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 96-99.
- Givens, D. I., Owen, E. & Adesogan, A. T. 2000. Current procedures, future requirements and the need for standardization. Teoksessa: Givens, D. I., Owen, E., Axford, R. F. E. & Omed, H. M. (toim.). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition.* s. 449-474.
- Greenhill, W. L. 1964. Plant juices in relation to silage fermentation. III. Effect of water activity of juice. *Journal of the British Grassland Society* 19: 336-339.
- Gross, F. & Beck, T. 1972. Vergleichende untersuchungen über die wirkung von silierhilfsmitteln. *Das Wirtschaftseigene Futter* 18(3): 161-177.
- Guillon, F. & Champ, M. M.-J. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition* 88(3): S293-S306.

- Haigh, P. M. & Parker, J. W. G. 1985. Effect of silage additives and wilting on silage fermentation, digestibility and intake, and on liveweight change of young cattle. *Grass and forage science* 40: 429-436.
- Hauggaard-Nielsen, H., Jørnsgaard, B., Kinane, J. & Jensen, E. S. 2008. Grain legume–cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems* 23(1): 3–12.
- Hellberg, A. 1967. A combination of nitrite and hexamine as an additive in the ensiling of herbage. *Journal of the British Grassland Society* 22: 289-292.
- Herrera-Velazco, J. M., Isaac-Virgen, M. L., Rodríguez-Macías, R., Zamora-Natera, F., Ruiz-López, M. A. & García-López, P. M. 2008. Chemical composition and alkaloids content of silages of *Lupinus exaltatus* and *Lupinus albus* cultivated in Jalisco, Mexico. Teoksessa: Palta, J. A. & Berger, J. B. (toim.). *Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.* s. 195-197.
- Herrmann, C., Heiermann, M. & Idler, C. 2011. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresource Technology* 102: 5153-5161.
- Hoffmann, M. 2012. Anforderungen an gras- und maissilage, LKV Sachsen, interne Mitteilung.
- Huhtanen, P., Nousiainen, J. & Rinne, M. 2006. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* 15: 293-323.
- Huisman, J., van der Poel, A. F. B., Verstegen, M. W. A. & van Weerden, E. J.. 1990. Antinutritional factors (ANF) in pig nutrition. *World Review of Animal Production* 25(2): 77-82..
- Huuskonen, A. & Joki-Tokola, E. 2010. Performance of growing dairy bulls offered diets based on silages made of whole-crop barley, whole-crop wheat, hairy vetch and grass. *Agricultural and Food Science* 19: 116-126.

Huyghe, C. 1997. White lupin (*Lupinus albus* L.). Field Crop Research 53: 147-160

Ilmatieteen laitos 2013. Vuodenaikojen tilastot. <http://ilmatieteenlaitos.fi/vuodenaikojen-tilastot>. Tulostettu 30.10.2013.

Jaakkola, S., Saarisalo, E. & Heikkilä, T. 2009. Formic acid treated whole crop barley and wheat silages in dairy cow diets: effects of crop maturity, proportion in the diet, and level and type of concentrate supplementation. Agricultural and Food Science 18: 234-256.

Jasaitis, D. K., Wohlt, J. E. & Evans, J. L. 1987. Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs *in vitro*. Journal of Dairy Science 70(7): 1391-1403.

Jaurena, G. & Pichard, G. 2001. Contribution of storage and structural polysaccharides to the fermentation process and nutritive value of lucerne ensiled alone or mixed with cereal grains. Animal Feed Science and Technology 92: 159-173.

Jones, R., Fychan, R., Evans, S. & Roberts, J. 1999. Effects of wilting and application of bacterial inoculant on the fermentation characteristics of lupin silage. Teoksessa: Pauly, T. (toim.). Silage Production in Relation to Animal Performance, Animal Health, Meat and Milk Quality. Conference proceedings. The XIIth International Silage Conference. July 5-7, 1999, Uppsala, Sweden. s. 98-99.

Jonsson, A. & Pahlow, G. 1984 Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with Lactobacillus cultures. Animal Research and Development 20: 7-22.

Kaiser, E., Weiss, K. & Milimonka, A. 1999. Untersuchungen zur gärqualität von silagen aus nitratarmem grünfutter. Archives of Animal Nutrition 52: 75-93.

Kaiser, E., Weiss, K. & Polip, I. V. 2002. A new concept for the estimation of the ensiling potential of forages. The XIIIth International silage conference, Sept. 11-13, SAC, Auchincruive Scotland. S. 344-358.

Kaiser, E., Weiss, K. & Polip, I. V. 2005. New results on inhibition of clostridia development in silages. Teoksessa: Dark, R. S. & Stronge, M. D. (toim.). Silage Production and Utilisation. Proceedings of the XIVth International Silage conference, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress, July 2005, Belfast, Northern Ireland. s. 213.

- Kangas, A., Laine, A., Niskanen, M., Salo, Y., Vuorinen, M., Jauhiainen, L. & Nikander, H. 2011. Virallisten lajikekokeiden tulokset 2004-2011. MTT Kasvu 18. 170 s.
- Kibe, K., Ewart, J. M. & McDonald, P. 1977. Chemical studies with silage microorganisms in artificial media and sterile herbages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28: 355-364.
- King, C., McEniry, J. & O'Kiely, P. 2012. A note on the fermentation characteristics of red clover silage in response to advancing stage of maturity in the primary growth. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 51: 79-84.
- Knický, M. & Lingvall, P. 2001. Possibilities to avoid growth of clostridia and/or fungi in wilted silage by use of organic and inorganic salts. Teoksessa: Gomide, J. A., Mattos, W. R. S. & DaSilva, S. C. (toim.). *Grassland Ecosystems: an Outlook into the 21st century. Proceedings of the XIXth International Grassland Congress, Sao Paulo, Brazil.* s. 788-789.
- Knický, M. & Lingvall, P. 2004. Ensiling of high wilted grass-clover mixture by use of different additives to improve quality, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, 54(4): 197-205.
- Knický, M. & Spörndly, R. 2009. Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2659-2667.
- Kochapakdee, S., Moss, B. R., Lin, J., Reeves, D. W., McElhenney, W. H., Mask, P. & van Santen, E. 2002. Evaluation of white lupin, temperate corn, tropical corn, and hybrid pearl millet silage for lactating cows. Teoksessa: van Santen, E. & Hill, G. D. (toim.). *Wild and Cultivated Lupins from the Tropics to the Poles. Proceedings of the 10th International Lupin Conference, Laugarvatn, Iceland, 19-24 June 2002. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.* s. 300-307.
- Kung, L. Jr., Robinson, J. R., Ranjit, N. K., Chen, J. H., Golt, C. M. & Pesek, J. D. 2000. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. *Journal of Dairy Science* 83(7): 1479-1486.

- Kung, L. Jr., Stokes, M. R. & Lin, C. J. 2003. Silage additives. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.). Silage Science and Technology. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. s. 305-360.
- Landrock-White, S. 2004. Unravelling the mystery of lupins. Technical Bulletin. Organic Studies Centre 6: 10-12.
- Lingvall, P. & Lättemäe, P. 1999. Influence of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and hygienic quality of wilted and long cut grass silage. Journal of the Science of Food and Agriculture 79(2): 257-264.
- Liu, S., Bischoff, K. M., Leathers, T. D., Qureshi, N., Rich, J. O. & Hughes, S. R. 2013. Butyric acid from anaerobic fermentation of lignocellulosic biomass hydrolysates by *Clostridium tyrobutyricum* strain RPT-4213. Bioresource Technology 143: 322-329.
- Lizarazo, C., Santanen, A. & Stoddard, F. 2010. Nutritive value of Finnish grown grain legumes. NJF Report 6(2): 80-83.
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramírez-Rodríguez, V. & Herrera-Estrella, L. 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Science 160: 1-13.
- Lück, E. & Jager, M. 1997. Antimicrobial Food Additives. 2. painos. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, GmbH. 260 s.
- Lättemäe, P. 1997. Ensiling and evaluation of forage crops. Effects of harvesting strategy and use of additives to fresh-cut and wilted crops. Väitöskirja. Swedish University of Agricultural Sciences. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria 32. Uppsala. 45 s.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clinical Chemistry Acta 17: 297-304.
- McDonald, P, Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. 1991. The Biochemistry of Silage. 2. painos. Chalcombe Publications. Marlow, UK. 340 s.

McDonald, P. & Whittenbury, R. 1973. The ensilage process. Teoksessa: Butler, G. W. & Bailey, R. W. (toim.). Chemistry and Biochemistry of Herbage. Vol 3. Academic Press, New York. s. 33-60.

McEniry, J., O'Kiely, P., Clipson, N. J. W., Forristal, P. D. & Doyle, E. M. 2007. The relative impacts of wilting, chopping, compaction and air infiltration on the conservation characteristics of ensiled grass. Grass and Forage Science 62(4): 470-484.

MMM 1999. Maa- ja metsätalousministeriön päätös tuoreen rehukasvin säilöntäaineista. Päätös no 48/1999. Annettu 22.04.1999. Maa- ja metsätalousministeriön määräyskokoelma.

Moran, J. P., Weinberg, Z. G., Ashbell, G., Hen, Y. & Owen, T. R. 1996. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. Teoksessa: Jones, D. I. H, Jones, R., Dewhurst, R., Merry, R. & Haigh, P. (toim.). Proceedings of the XIth International Silage Conference 1996, held at the University of Wales, Aberystwyth 8th-11th September 1996. s. 162-163.

Morrison, I. M. 1988. Influence of some chemical and biological additives on the fibre fraction of lucerne on ensilage in laboratory silos. The Journal of Agricultural Science 111: 35-39.

MTT 2013. Rehutaulukot ja ruokintasuosituksset (verkkojulkaisu). Jokioinen: MTT Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. (viitattu 21.10.2013). Saatavissa: <http://www.mtt.fi/rehutaulukot>.

Muck, R. E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. Journal of Dairy Science 71(11): 2992-3002.

Murphy, S. R., McNiven, M. A., MacLeod, J. A. & Halliday, L. J. 1993. Grass and lupin silage rations for beef steers supplemented with barley or potatoes. Animal Feed Science and Technology 40: 273-283.

Nadeau, E. 2007. Effects of plant species, stage of maturity and additive on the feeding value of whole-crop cereal silage. Journal of the Science of Food and Agriculture 87: 789-801.

Nemecek, T., von Richthofen, J.-S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R. & Pahl, H. 2008. Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy* 28: 380-393.

Nousiainen, J., Rinne, M. Hellämäki, M. & Huhtanen, P. 2003. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology* 103: 97-111.

Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H. & Spoelstra, S. F. 2003. Microbiology of Ensiling. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. s. 31-93.

Pahlow, G., Rammer, C., Slottnier, D. & Tuori, M. 2002. Ensiling of forage legumes. Teoksessa: Wilkins, R.J. (toim.). *Low input animal production based on forage legumes for silage (LEGSIL)*. Final report. s. 141-153.

Peiretti, P. G., Daprà, F., Zunino, V. & Meineri, G. 2010. The effect of harvest date on the chemical composition, gross energy, organic matter digestibility, nutritive value and amino acid content of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Cuban Journal of Agricultural Science* 44: 173-177.

Peltonen-Sainio, P., Jauhiainen, L., Hyövelä, M. & Nissilä, E. 2011. Trade-off between oil and protein in rapeseed at high latitudes : Means to consolidate protein crop status? *Field Crops Research* 121: 248-255.

Petterson, D. S., Sipsas, S. & Mackintosh, J. B. 1997. The chemical composition and nutritive value of Australian pulses. 2. painos. Grains Research and Development Corporation, Canberra.

Petterson, D. S. 2000 The use of lupins in feeding systems – review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 13(6): 861-882.

Pieper, B. & Korn, U. 2009. Conservation of nearly un-fermentable feedstuffs using homolactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862 and 8866) in combination with formic acid. Teoksessa: Broderick, G. A., Adesogan, A. T., Bocher, L. W., Bolsen, K. K., Contreras-Govea, F. E., Harrison, J. H. & Muck, R. E. (toim.). XVth International Silage Conference Proceedings, July 27-29, 2009, Madison, Wisconsin. s.297-298.

Pieper, B., Pieper, R. & Korn, U. 2012. Influence of homolactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862 and 8866) in combination with molasses or partly neutralized formic acid while ensiling of nearly unfermentable feedstuffs on the content of biogenic amines and clostridia spores. Teoksessa: Kuoppala, K., Rinne, M. & Vanhatalo, A. (toim.). Proceedings of the XVI international silage conference Hämeenlinna, Finland, 2-4 July 2012. s. 262-263.

Playne, M. J. & McDonald, P. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. Journal of the Science of Food and Agriculture 17: 264-268.

Plöchl, M., Zacharias, H., Herrmann, C., Heiermann, M. & Prochnow, A. 2009. Influence of Silage Additives on Methane Yield and Economic Performance of Selected Feedstock. Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Manuscript 1123, vol. XI, June 2009.

Polip, I. V. 2001. Untersuchungen zur unterbindung von buttersäuregärung und clostridienaktivität in silage aus nitratarmer grünfutter. Väitöskirja. Humboldt-Universität, Berlin. 128 s.

Pursiainen, P. & Tuori, M. 2008. Effect of ensiling field bean, field pea and common vetch in different proportions with whole-crop wheat using formic acid or an inoculant on fermentation characteristics. Grass and Forage Science 63(1): 60-78.

Rammer, C. 1996. Quality of grass silage infected with spores of *Clostridium tyrobutyricum*. Grass and Forage Science 51(1): 88-95.

Rammer, C. & Lingvall, P. 1997. Influence of Farmyard Manure on the Quality of Grass Silage. Journal of the Science of Food and Agriculture 75: 133-140.

Richardt, W. 2012. Silage quality and animal health. Teoksessa: Auerbach, H., Lückstädt, C. & Weissbach, F. (toim.). The Future of Silage Preservation. Proceedings of 1st International Silage Summit. Leipzig, November 12th, 2012. s. 43-66.

- Rondahl, T., Bertilsson, J., Lindgren, E. & Martinsson, K. 2006. Effects of stage of maturity and conservation strategy on fermentation, feed intake and digestibility of whole-crop pea-oat silage used in dairy production. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*, 56(3-4): 137-147.
- Rooke, J. A. & Hatfield, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. s. 95-139.
- Saastamoinen, M. & Eurola, M. 2012. Palkokasvien, herneen, härkäpavun, sini- ja valkolupiinin sekä soijan kemiallinen laatu Suomen oloissa viljeltynä. Julkaisussa: Schulman, N. & Kauppinen, H. .Maataloustieteen Päivät 2012 (verkkojulkaisu). Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisuja no 28. Viitattu 15.11.2013. Julkaistu 15.1.2012. Saatavilla Internetissä: http://www.smts.fi/Valkuaisomavaraisuus/Saastamoinen_Palkokasvien.pdf
- Salo, M.-L. 1965. Determination of carbohydrate fractions in animal food and faeces. *Acta Agralia Fennica* 105: 1-102.
- Salo, M.-L. & Salmi, M. 1968. Determination of starch by the amyloglucosidase method. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 40: 38-45.
- Schmidt, L., Weissbach, F., Wernecke, K.-D. & Hein, E. 1971. Erarbeitung von parametern für die vorhersage und steuerung des gärverlaufes bei der grünfuttersilierung. Forschungsbericht. Oskar-Kellner-Institut für Tierernährung, Rostock, Deutschland.
- Scudamore, K. A. & Livesey, C. T. 1998. Occurrence and signiücance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 1-17.
- Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101: 514-525.
- Sheldrick, R. D., Tayler, R. S., Maingu, Z. & Pongkao, S. 1980. Initial evaluation of lupin for forage. *Grass and Forage Science* 35: 323-327.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68.

Spears, J.W. 1994. Minerals in forages. In: G. C. Fahey, G.C., jr. (toim.). Forage quality, evaluation, and utilization. National Conference on Forage Quality, Evaluation, and Utilization. University of Nebraska. s. 281-317.

Spoelstra, S. F. 1983. Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 145-152.

Spoelstra, S. F. 1985. Nitrate in Silage. *Grass and Forage Science* 40: 1-11.

Spörndly, R. 1995. Fodertabeller för idisslare 1995. Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för hjordjurens utfodring och vård. Rapport 235. Uppsala.

Stoddard, F. 2012. Increasing the range of legume crops for Finnish crop rotations. Julkaisussa: Schulman, N. & Kauppinen, H. .Maataloustieteen Päivät 2012 (verkkojulkaisu). Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisuja no 28. Viitattu 1.11.2013. Julkaistu 15.1.2012. Saatavilla Internetissä: http://www.smts.fi/Valkuaisomavaraisuus/Stoddard_Increasing.pdf

Stoddard, F., Nykänen, A. & Lizarazo, C. 2012. Palkoviljojen lajikkeet siemeneksi ja säilörehuksi. Julkaisussa: Nykänen, A. (toim.). 2012. Typpi- ja valkuaisomavaraisuuden lisääminen palkokasveja tehokkaasti hyödyntämällä. MTT Raportti 59. MTT Jokioinen. s. 61-65.

Strydhorst, S. M., King, J. R., Lopensky, K. J. & Harker, N. 2008. Forage potential of intercropping barley with faba bean, lupin, or field pea. *Agronomy Journal* 100(1): 182-190.

Suokannas, A., Pehkonen, A., Mäkinen, H., Tuori, M. & Pentti, S. 2003. Kokoviljasäilörehu karjatilalla. Maa- ja elintarviketalous 40. Vakola, Suomi. MTT maatalousteknologian tutkimus. 76s.

Tike 2012. Maatilatilastollinen vuosikirja 2012. Maa-, metsä- ja kalatalous 2012. Helsinki, Suomi. Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskus. 269 s.

Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2006. Biologian sanakirja. Uudistetun laitoksen 3. painos. Kustannusosakeyhtiö Otava, Helsinki, Suomi. 888s.

Trugo, L. Z. & Almeida, D. C. F. 1988. Oligosaccharide contents in the seeds of cultivated lupins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 45: 21-24.

Tuori, M., Kuoppala, K., Pursiainen, P. & Munck, M. 2006. Korjuuajan vaikutus nurmipalkokasvien kivennäispitoisuuteen. Maataloustieteen Päivät 2012 (verkkojulkaisu). Suomen Maataloustieteellisen Seuran tiedote no 21. Viitattu 10.1.2013. Julkaistu 9.1.2006. Saatavilla Internetissä: <http://www.smts.fi/pos06/1107.pdf>

van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.

Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffe, M. C., De Jong, P. & Lankveld, J. M. G. 2006. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 89: 850-858.

von Lengerken, J. & Zimmermann, K. 1991. *Handbuch futtermittelprüfung*. Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, 1. Auflage.

Weinberg, Z. G. & Muck, R. E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 53-68.

Weisbjerg, M. R. & Søgaard, K. 2008. Feeding value of legumes and grasses at different harvest times. Teoksessa: Hopkins, A., Gustafsson, T., Bertilsson, J., Dalin, G., Nilsson-Linde, N. & Spörndly, E. (toim.). *Biodiversity and Animal Feed: Future Challenges for Grassland Production*. Proceedings of the 22nd General Meeting of the European Grassland Federation, Uppsala, Sweden, 9-12 June 2008. s. 513-515.

Weiss, K. 2001. Gärungsverlauf und gärqualität von silagen aus nitratarmem grünfutter. Väitöskirja. Humboldt Universität. 181 s.

Weiss, K. & Kaiser, E. 1996. Milchsäurebestimmung in silageextrakten mit hilfe der HPLC. *Das Wirtschaftseigene Futter* 41: 69-80.

Weiss, K., Kaiser, E. & Taube, F. 2006. Content of nitrate in green forage and its effect on silage quality. Teoksessa: Lloveras, J., Gonzáles-Rodríguez, A., Vázquez-Yáñez, O., Piñeiro, J., Santamaría, O., Olea, L. & Poblaciones, M. J. (toim.). *Sustainable Grassland Productivity*. 21st General Meeting of European Grassland Federation, Badajoz, Spain 3-6th April 2006. s. 56-58.

Weissbach, F. 1992. Determination of the buffering capacity. Internal Report. Institute of Grassland and Forage Research, Braunschweig. 3 s.

Weissbach, F. 1999. Consequences of grassland de-intensification for ensilability and feeding value of herbage. *Landbauforschung Voelkenrode*, special issue 206: 41-53

Weissbach, F. & Auerbach, H. 2012. The future of forage conservation. Teoksessa: Auerbach, H., Lückstädt, C. & Weissbach, F. (toim.). *The Future of Silage Preservation. Proceedings of 1st International Silage Summit*. Leipzig, November 12th, 2012. s. 5-42.

Weissbach, F. & Honig, H. 1996. Über die vorhersage und steuerung des gärungsverlaufs bei der silierung von grünfütter auf extensivem anbau. *Landbauforschung Völkenrode Heft* 46: 10–17.

Weissbach, F., Schmidt, L. & Hein, E. 1974. Method of anticipation of the run of fermentation in silage making, based on the chemical composition of green fodder. *Proceedings of the XIIth International Grassland Congress, Moscow, Soviet Union*. s. 663–673.

Weissbach, F. & Strubelt, C. 2008. Correcting the dry matter content of grass silages as a substrate for biogas production. *Landtechnik* 63(4): 210-212.

Weissbach, F., Zwierz, P. M., Reuter, B., Köller, S., Weissbach, H. & Baronius, W. 1989. Control of the silage fermentation by chemical preserving agents. *Chimica Oggi* 7(10): 57-60.

Whitehead, D.C., Goulden, K.M. & Hartley, R.D. 1985. The distribution of nutrient elements in cell wall and other fractions of the herbage of some grasses and legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 311-318.

Wieringa, G. W. 1985, The effect of wilting on butyric acid fermentation in silage. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 6: 204-210.

Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K. & Lin, C. J. 2003. History of Silage. Teoksessa: Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. (toim.). *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. s. 1-30.

- Wilkinson, J. M. & Davies, D. R. 2012. Targets for the aerobic stability of silage. Teoksessa: Kuoppala, K., Rinne, M. & Vanhatalo, A. (toim.). Proceedings of the XVI international silage conference Hämeenlinna, Finland, 2-4 July 2012. s. 67-68.
- Wink, M. 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (*Fabaceae*). South African Journal of Botany 89: 164-175.
- Wink, M., Meissner, C. & Witte, L. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. Phytochemistry 38(1): 139-153.
- Winters, A.L., Whittaker, P.A. & Wilson, R.K. 1987. Microscopic and chemical changes during the first 22 days in Italian ryegrass and cocksfoot silages made in laboratory silos. Grass and forage science 42: 191-196.
- Woolford, M. K. 1975. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additives. Journal of the Science of Food and Agriculture 26: 219-228.
- Zdunczyk, X., Juskiewicz, J., Frejnager, S. & Gulewicz, K. 1998. Influence of alkaloids and oligosaccharides from white lupin seeds on utilization of diets by rats and absorption of nutrients in the small intestine. Animal Feed Science Technology 72: 143-154.

LIITTEET

Liite 1: Lupiinin ensisijaiset ja toissijaiset kehitysvaiheet ja niiden kuvaukset

Lupiinin palot kehittyvät versojen haaroihin ja lupiinin kehitysvaiheet määritellään alimman (kehittyneimmän) haaran mukaan. Yksittäisen kasvin kasvuaste määritellään kasvin saaman suurimman numeerisen kasvuvaiheen perusteella. (Dracup ja Kirby 1996).

0 Itäminen ja taimettuminen	
0.0	Kuiva siemen
0.1	Veden imeytyminen, siemenen turpoaminen
0.2
0.3	Sirkkajuuren työntyminen siemenkuoren lävitse
0.4
0.5	Sirkkajuuri 5mm mittainen (itäminen)
0.6
0.7	Sirkkavarren työntyminen siemenkuoren lävitse
0.8
0.9	Osan siementaimenesta työntyminen maanpinnan yläpuolelle (taimettuminen)
1 Lehtien kehittyminen	
1.0	Ensimmäisen lehtiparin työntyminen sirkkalehtien ulkopuolelle
1.1	1 lehti tullut esiin kärkisilmusta (samanaikaisesti 1.2 kanssa)
1.2	2 lehteä tullut esiin kärkisilmusta
1.3	3 lehteä tullut esiin kärkisilmusta (samanaikaisesti 1.4 kanssa)
1.4	4 lehteä tullut esiin kärkisilmusta
1.5	5 lehteä tullut esiin kärkisilmusta
1.6	6 lehteä tullut esiin kärkisilmusta
1.7	7 lehteä tullut esiin kärkisilmusta
:
1.10	10 lehteä tullut esiin kärkisilmusta
1.11	11 lehteä tullut esiin kärkisilmusta
:
1.n	n lehteä tullut esiin kärkisilmusta
2 Varren pituuskasvu	
2.0
2.1	Lehdenpohjien välillä pieni ero
2.2
2.3	Joidenkin lehdenpohjien välillä selvä ero
2.4
2.5	Useat lehdenpohjat selvästi erottuneet toisistaan
2.6
2.7	Kukinnon nuppu selvästi näkyvillä
2.8
2.9	Kukinnon nuppu selvästi erottunut varrella ylimpien lehtien pohjasta
3 Kukinto	
3.0	Suojuslehdet peittävät kukan teriön kokonaan
3.1	Tiukka nuppu
3.2	Nuppu löyhtynyt
3.3	Erottautuva purje (kukinta)
3.4	Avonainen kukka
3.5	Teriö värjäytynyt
3.6
3.7	Vanhentunut kukka
3.8	Kukka varissut
3.9	Palko muodostunut

4 Palon kypsyminen	
4.0	Nuori, vihreä palko, siementen välillä ei väliseinää, siemenet täyttävät koko palon
4.1	Nuori, vihreä palko, siementen välillä ei väliseinää, siemenet erottautuneet toisistaan
4.2	Vihreä palko, siementen välillä väliseinä, palon seinämät pullistuneet hieman, siemenet täyttävät 50 % väliseinien välisestä tilasta
4.3	Siemenet täyttävät 75 % väliseinien välisestä tilasta
4.4	Vihreä palko, palon seinämissä selvät pullistumat, siemenet täyttävät koko väliseinien välisen tilan
4.5	Vihreä palko, väliseinät hajonneet
4.6
4.7	Palko muuttumassa khakinväriseksi
4.8
4.9	Palko vaalean punaruskea ja ryppyinen
5 Siementen kypsyminen	
5.0	Siemen pieni, tummanvihreä, sisus vetinen
5.1	Siemen keskikokoinen, tummanvihreä, sisus vetinen
5.2	Siemen suuri, tummanvihreä, sisus vetinen
5.3	Siemen suuri, vihreä, sisältö hieman vetinen
5.4	Siemen suuri ja pehmeä, vaaleanvihreä kuori, ei vetistä sisusta, vihreät alkeislehdet
5.5	Siemen suuri, kuoren väri vaaleanvihreästä vaaleaan siniharmaaseen, vihreät alkeislehdet
5.6	Siemen suuri ja pehmeä, kuoren väri vaaleanvihreästä vaaleaan siniharmaaseen, alkeislehtien väri vihreästä keltaiseen
5.7	Siemen suuri ja pehmeä, vaalean kellertävänruskea kuori, alkeislehtien väri keltaisesta oranssiin (fysiologinen kypsyys)
5.8	Siemen kova, mutta pureskeltava, täplikäs (joillakin lajikkeilla), kuori vaalea kellertävänruskea
5.9	Siemenet kovia ja kypsiä korjattavaksi